

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Fisiología Animal

BIBLIOTECA UCM



5300899218

**CORRELACIONES ENTRE TAMAÑO  
FOLICULAR Y NIVELES DE HORMONAS  
ESTEROIDES EN GANADO VACUNO**



Gema Silván Granado

Madrid, 1992



La Tesis Doctoral de D. *Gerardo Silva Gamado*

.....  
Titulada *"Conclusiones ante hechos folclóricos  
y niveles de hominización, en grado humano"*  
Director Dr. D. *Juan Carlos Illán del Pozo*.....

fue leída en la Facultad de *Veterinaria*.....  
de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día *16*..  
de *Diciembre*..... de 19*71*..., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE *Manuel Tenorio Miras Portugal*.....

VOCAL *Tamara Pérez García*.....

VOCAL *Carlos César Pérez García*.....

VOCAL *Santiago Martín Rillo*.....

SECRETARIO *Leopoldo Quillera Carrasco*.....

.....  
habiendo recibido la calificación de *Apto. "cum laude"*  
*por unanimidad*.....

Madrid, a *16* de *Diciembre* de 19*71*).

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

*[Firma]*

Gema Silván Granado

*"CORRELACIONES ENTRE TAMAÑO FOLICULAR Y NIVELES DE  
HORMONAS ESTEROIDES EN GANADO VACUNO".*

Departamento de Fisiología Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1991

**"CORRELACIONES ENTRE TAMAÑO FOLICULAR  
Y NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDES EN  
GANADO VACUNO".**


MEMORIA que para la  
obtención del grado de Doctor,  
presenta la Licenciada en  
Veterinaria Dña. Gema Silván  
Granado.

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA  
BAJO LA DIRECCION DE:



Prof. Dr. Juan Carlos Illera del Portal

Licenciada Dña. Gema Silván  
Granado, aspirante al grado de  
Doctor en Veterinaria.



Madrid, Octubre, 1991



## AGRADECIMIENTOS

Esta Memoria ha sido realizada bajo la dirección del Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, Profesor Titular del Departamento de Fisiología Animal, de la Facultad de Veterinaria de Madrid, a quien deseo expresar mi más profundo agradecimiento por la inmensa ayuda aportada a lo largo de todo el proceso de "Desarrollo y Gestación" de la misma, no sólo por el apoyo material y científico, sino y lo que es más importante, por su estímulo y empuje en todas las "horas bajísimas" que ha habido desde el comienzo hasta hoy y que han posibilitado el que este trabajo haya llegado a presentarse.

En segundo lugar, deseo expresar mi agradecimiento al Dr. D. Mariano Illera Martín, Director del Departamento de Fisiología Animal de la UCM y Catedrático del Departamento de Fisiología Animal I de la Facultad de Veterinaria de Madrid, por haberme permitido desarrollar esta investigación en las instalaciones del Departamento que él dirige, haberme proporcionado la infraestructura necesaria para ello y por todos los buenos consejos que de él he recibido a lo largo de la realización de este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer a D. Fernando Pescador, Director del Centro de Cálculo de la UCM Somosaguas, el Diseño del análisis estadístico de nuestros resultados, sin el cual no se habría podido llegar a todas las conclusiones que hemos extraído de ellos. También quiero expresar mi agradecimiento a María del Carmen Alvarez, María José Alvarez, Justino Fernández y todas aquellas personas de este departamento que han colaborado.

Mi agradecimiento también a la Dra Coralie Munro, Profesora del Departamento de Reproducción de la Universidad de California Davis, por el grandísimo apoyo científico que nos ha prestado en la puesta a punto de la técnica ELISA.

A la Profa. Dra. Dña. María Teresa Miras Portugal (Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de

Veterinaria), por las facilidades prestadas para la utilización de sus instalaciones

Al Departamento de Bromatología de la Facultad de Veterinaria, por su ayuda en la liofilización de anticuerpos y conjugados.

También quiero expresar mi agradecimiento a los Directores de los Mataderos Municipal de Madrid (Sr. Díaz Yubero) y Giresa de Colmenar Viejo (Sr. Rodríguez Marín), por haberme permitido recoger las muestras empleadas en la realización de esta memoria, así como a todo el personal de las naves de matanza.

A todos mis compañeros del Departamento de Fisiología, especialmente a Rosa, Joaquín y Josefina, que me han ayudado en todo momento. A los dos "Jesuses", por los estupendos cuidados que han recibido (y siguen recibiendo) mis animales.

Quiero agradecer también a la Familia Martín, de San Juan de la Encinilla (Avila) toda la ayuda que me han prestado y gracias a los cuales se ha podido realizar una parte importantísima de este trabajo.

Deseo agradecer también a mi "sufrida" Familia, todo el tiempo que me ha tenido que soportar durante los años que ha durado la realización de este trabajo, en especial a mi hermana Paloma.

Por último, quiero agradecer a mis amigos la paciencia que han tenido conmigo a lo largo de estos años y todo el estímulo y ayuda que me han prestado.

**A mi Familia.**

# **CONTENIDO**



- I.- Producción de anticuerpos policlonales frente a cada una de las hormonas esteroideas.
- II.- Purificación de los anticuerpos policlonales producidos.
- III.- Caracterización de los anticuerpos purificados.
- IV.- Conjugación de las hormonas esteroideas a la enzima marcadora.
- V.- Caracterización de los conjugados.
- VI.- Estandarización propiamente del método ELISA de competición.
- VII.- Procesado de resultados:
  - Procesado de los resultados obtenidos en los análisis.
  - Análisis estadístico.

**- RESULTADOS:**

153-207

- 1.- Producción y caracterización de anticuerpos policlonales frente a estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona.
- 2.- Caracterización de los conjugados peroxidasa- estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona.
- 3.- Trazado de las curvas patrón de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona.
- 4.- Cálculo de las concentraciones plasmáticas y foliculares de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona.
- 5.- Validación del ELISA de competición para la determinación de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona.
- 6.- Concentraciones plasmáticas de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona a lo largo del ciclo estral en la vaca.

7.- Tablas de resultados del estudio estadístico. Medias ( $\pm$  E.S.M) de las variables estadísticas analizadas. Test de diferencia de medias, tablas de correlaciones.

8.- Rectas de regresión entre concentraciones sanguíneas y foliculares.

- DISCUSION	1920
- CONCLUSIONES	2422
- BIBLIOGRAFIA	2424

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- A: Andr geno
- AA: Amplificación de la Actividad
- ABP: Androgen Binding Protein
- ABTS: Acido 2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiazolino sulfónico)
- Ac: Anticuerpo
- Ac 5AS: Acido 5 acetil-salicílico
- ACF: Adyuvante Completo de Freund
- AIF: Adyuvante Incompleto de Freund
- ANCHUOVA: Anchura del Ovario
- ANTI: Anticuerpo
- ASP: Anticuerpo unido a fase sólida
- BSA: Albúmina sérica bovina
- CA: Cromatografía de afinidad
- CDI: Carbodi mida
- CETE: Carboxietiltio  ter
- CHOL: Colesterol
- CMC: 1-ciclohexil-3(2-morfolino-4-etil)carbodi mida
- CME: Carboximetil  ter
- CMO: Carboximetiloxima
- CMTE: Carboximetil tio éter
- % CV: Coeficiente de variación
- DA: Doble Anticuerpo
- DASP: Doble Anticuerpo en fase sólida
- DEAE: Dietil aminoetil
- 20 DHP4: 20 Dihidroprogesterona
- 20 DHP4: 20 Dihidroprogesterona
- 5 DHT: 5 Dihidrotestosterona
- DNP: Dinitrofenil-fosfato
- E: Esteroide
- E1: Estrona
- E2: Estradiol-17 
- E3: Estriol



- EDAC: 1-Eth-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- ELA: Enzimmunoanálisis
- ELISA: Enzyme linked Immunosorbent assay
- EMIT: Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
- ENZ: Enzima
- E.S.M.: Error Estándar de la Media
- ESTRASAN: Estradiol-17 $\beta$  sanguíneo
- ESTRAFO: Estradiol-17 $\beta$  foliular
- FSH: Follicle stimulating hormone
- $\beta$ -GAL:  $\beta$  Galactosidasa
- Gluc: Glucosido
- Glucosa 6P-DH: Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa
- GnRH: gonadotrophin releasing hormone
- H: Hormona sin marcar o libre
- H\*: Hormona marcada
- HDL: Lipoproteína de Alta Densidad
- HET: Heterólogo
- HG: Hemigherato
- HM: Hemimaleato
- HOM: Homólogo
- HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
- HRP: Horse Radish Peroxidase (Peroxidasa de rábano picante)
- HS: Hemisuccinato
- HSA: Albúmina sérica humana
- IDMS: Múltiples sitios intradérmicos
- IgG: Inmunoglobulina G
- IM: Intramuscular
- IP: Intraperitoneal
- IRMA: Técnica Immunoradiométrica
- IV: Intravenoso
- LD: Límite de Detección
- LH: Luteinizing hormone
- LDL: Lipoproteína de baja densidad

- LONGOVA: Longitud del Ovario
- LYS: Lisozima
- M: Molar
- MA: Modulación de la Actividad
- mg: Miligramos
- MSSC: Múltiples sitios subcutáneos
- 4-m-uβ-D-G: 4-m-umbeliferil-β-D-galactosidasa
- NAD: dinucleótido nicotinamida adenina
- NFOLICUL: Nº de Folículos
- ng: Nanogramos
- NHS: N-Hidroxi-Sucinimida
- NPH-Gal: Nitrofenil-galactopiranosido
- NZW: New Zealand White
- OA: Ovoalbúmina
- o-NPG: o-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido
- OPD: Ortofenilén Diamina
- P4: Progesterona
- P-AP: Peroxidasa- Antiperoxidasa
- PBS: Tampón Fosfato Salino
- PESOOVA: Peso del Ovario
- pg: Picogramos
- PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandina F<sub>2α</sub>
- p-NPP: p-Nitrofenil fosfato
- PREG: Pregnenolona
- PROG: Progesterona
- PROGESAN: Progesterona sanguínea
- PROGESFO: Progesterona folicular
- PT: Tioglobulina porcina
- RC: reacción cruzada
- RIA: Radioinmunoanálisis
- RM: Relación Molar
- RSA: Albúmina sérica de conejo
- S 50%: Sensibilidad al 50% de unión

- SC: Subcutáneo
- SCC: Side chain cleavage (sistema enzimático mitocondrial)
- T: Testosterona
- T°: Temperatura
- Tº: Tiempo
- TA: Temperatura Ambiente
- TE: Tioetil
- TESTOSAN: Testosterona sanguínea
- TESTOSFO: Testosterona folicular
- TG: Tiroglobulina
- TMB: Timidil-benzidina
- TME: Tiometiléter
- TNBS: Acido Trinitrobenceno sulfónico
- UGD: Ultracentrifugación de gradiente de densidad
- UV: Ultravioleta
- µg: Microgramos

## **OBJETIVO**

El crecimiento y la diferenciación folicular a lo largo de la vida reproductiva de la vaca son fenómenos complejos, existiendo aún lagunas significativas en la comprensión de todos los mecanismos que intervienen en el desarrollo y regulación de los mismos. La mayoría de las investigaciones se han dirigido hacia el estudio de los acontecimientos endocrinos y/o morfológicos que tienen lugar a nivel ovárico, sin prestar excesiva atención a los acontecimientos endocrinos que tienen lugar simultáneamente a nivel sanguíneo.

Existe una gran controversia en la explicación de cómo se desarrollan los dos fenómenos en esa especie, con el resultado final de la selección de un folículo antral de entre un grupo de ellos, del mismo tamaño y características. Todas las hipótesis apuntan hacia la idea de la "dominancia" de ese folículo sobre el resto, impidiendo su desarrollo y apareciendo seguidamente la atresia folicular.

Todavía se sabe poco acerca del patrón de crecimiento folicular de la vaca. Se ha señalado un patrón de crecimiento folicular continuo y otro en oleadas a lo largo del ciclo estral, sin que los autores se pongan de acuerdo sobre cuál es el que tiene lugar realmente, aunque lo que sí es cierto es que existen en el ovario folículos antrales de distintos tamaños con unas características endocrinas particulares. Tampoco han sido caracterizadas las interrelaciones endocrinas de los folículos de distinto tamaño presentes en el ovario, extensamente. Tampoco hay un número relevante de estudios que relacionen el tamaño folicular, sus características endocrinas y las repercusiones hormonales que en ese momento tienen lugar a nivel sanguíneo.

Los métodos que se han utilizado para el estudio de la dinámica folicular en vacas incluyen entre otros, los siguientes:

- a) Contaje de los folículos antrales presentes en los ovarios obtenidos en el matadero o mediante métodos quirúrgicos, con o sin posterior

medida de las concentraciones de las hormonas esteroides presentes en el líquido folicular.

- b) Seguimiento de folículos individuales a lo largo del ciclo mediante marcaje con tinción.
- c) Observación del nuevo crecimiento y desarrollo folicular después de la destrucción de los folículos grandes, presentes en los ovarios.
- d) Ultrasonografía de los ovarios con seguimiento diario de los folículos antrales de distintos tamaños, a lo largo de todo el ciclo estral.

Como hemos señalado los factores que influyen en la dinámica folicular en la vaca son muy complejos y todavía no se han determinado en su totalidad. Se ha señalado la existencia de factores reguladores intra y extraováricos de diversa naturaleza. Entre ellos podemos destacar las acciones de las distintas hormonas esteroides, tanto andrógenos como estrógenos, que ejercen una regulación endocrina y paracrina en el crecimiento y desarrollo folicular, acciones que tampoco son conocidas aún en su totalidad, puesto que las vías de la esteroidogénesis folicular son uno de los puntos oscuros que existen actualmente en el estudio de la fisiología folicular vacuna. Otros posibles factores que influyen en esta dinámica folicular son entre otros la edad, el estado nutricional de los animales, la presencia o ausencia de cuerpo lúteo en los ovarios, la posición de los ovarios, puesto que el ovario derecho es funcionalmente más activo que el izquierdo en esta especie, etc.

Por otro lado, son pocas las investigaciones, hasta el momento, que se han enfocado hacia el estudio de las posibles correlaciones existentes entre los fenómenos endocrinos sanguíneos y foliculares que se producen simultáneamente, sobre todo en lo que se refiere a las hormonas esteroides funcionalmente más representativas a ambos niveles, como por ejemplo estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona. Tampoco se ha prestado excesiva atención a la influencia que otros factores puedan ejercer sobre estas correlaciones como por ejemplo la edad, el

número de folículos de distintos tamaños presentes en los ovarios y el volumen de líquido folicular de estos folículos.

La determinación de las hormonas esteroides tanto a nivel sanguíneo como folicular requiere la utilización de unas técnicas analíticas con unas características muy especiales. La técnica más extensamente utilizada ha sido el radioinmunoanálisis (RIA) que posee frente a sus enormes ventajas, varios inconvenientes, lo que ha motivado, en los últimos años, el desarrollo de técnicas inmunológicas alternativas, sin isótopos radiactivos, que poseyendo las ventajas del RIA no presenten sus inconvenientes.

El desarrollo de las técnicas enzimoimmunoanalíticas para la determinación de hormonas esteroides está adquiriendo, hoy en día, un auge espectacular, habiéndose ya determinado éstas en sangre, leche, orina y saliva y sin embargo, todavía no se han utilizado en líquido folicular.

Nuestro objetivo principal ha sido:

La estandarización y validación de un método sencillo y repetitivo para el análisis de las concentraciones de las hormonas esteroides: estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona, tanto en el plasma como en el líquido folicular de hembras de ganado vacuno de distintas edades.

Para hacer esto realidad se precisa:

- 1º.- Producción de anticuerpos policlonales específicos para cada una de las hormonas. Estos anticuerpos serán purificados y caracterizados para la técnica que se va a desarrollar (ELISA de competición).
- 2º.- Obtención de conjugados hormona-enzima y su posterior purificación y caracterización.

- 3º.- Estandarización y validación propiamente dichas del método para cada hormona.

Conseguido ésto se procederá al estudio de los siguientes parámetros sanguíneos y ováricos de las hembras de ganado vacuno, obtenidos al azar en el matadero:

- a) Parámetros ováricos: longitud, anchura y peso.
- b) Número y volumen de líquido folicular de los folículos (Análisis individualizado de los folículos, en los que sea posible).
- c) Situación del ovario.
- d) Determinación de niveles hormonales en sangre y líquido folicular de las tres hormonas esteroides ya mencionadas.
- e) Estudio de la atresia folicular en los folículos de distintos tamaños, mediante la ayuda de un criterio endocrino de clasificación de la funcionalidad de estos folículos.
- f) Análisis estadístico detallado para la obtención de las posibles correlaciones existentes a los dos niveles: sanguíneo y folicular, utilizando como variables estadísticas los parámetros anteriormente mencionados, haciendo especial hincapié en el estudio de la atresia folicular.





# INTRODUCCION

10

12

14

16

18

20

22

24

26

28

30

32

34

36

38

40

42

44

46

48

50

52

54

56

58

60

62

64

66

68

70

72

74

76

78

80

82

84

86

88

90

92

94

96

98

100

102

104

106

108

110

112

114

116

118

120

122

124

126

128

130

132

134

136

138

140

142

144

146

148

150

152

154

156

158

160

162

164

166

168

170

172

174

176

178

180

182

184

186

188

190

192

194

196

198

200

202

204

206

208

210

212

214

216

218

220

222

224

226

228

230

232

234

236

238

240

242

244

246

248

250

252

254

256

258

260

262

264

266

268

270

272

274

276

278

280

282

284

286

288

290

292

294

296

298

300

302

304

306

308

310

312

314

316

318

320

322

324

326

328

330

332

334

336

338

340

342

344

346

348

350

352

354

356

358

360

362

364

366

368

370

372

374

376

378

380

382

384

386

388

390

392

394

396

398

400

402

404

406

408

410

412

414

416

418

420

422

424

426

428

430

432

434

436

438

440

442

444

446

448

450

452

454

456

458

460

462

464

466

468

470

472

474

476

478

480

482

484

486

488

490

492

494

496

498

500

502

504

506

508

510

512

514

516

518

520

522

524

526

528

530

532

534

536

538

540

542

544

546

548

550

552

554

556

558

560

562

564

566

568

570

572

574

576

578

580

582

584

586

588

590

592

594

596

598

600

602

604

606

608

610

612

614

616

618

620

622

624

626

628

630

632

634

636

638

640

642

644

646

648

650

652

654

656

658

660

662

664

666

668

670

672

674

676

678

680

682

684

686

688

690

692

694

696

698

700

702

704

706

708

710

712

714

716

718

720

722

724

726

728

730

732

734

736

738

740

742

744

746

748

750

752

754

756

758

760

762

764

766

768

770

772

774

776

778

780

782

784

786

788

790

792

794

796

798

800

802

804

806

808

810

812

814

816

818

820

822

824

826

828

830

832

834

836

838

840

842

844

846

848

850

852

854

856

858

860

862

864

866

868

870

872

874

876

878

880

882

884

886

888

890

892

894

896

898

900

902

904

906

908

910

912

914

916

918

920

922

924

926

928

930

932

934

936

938

940

942

944

946

948

950

952

954

956

958

960

962

964

966

968

970

972

974

976

978

980

982

984

986

988

990

992

994

996

998

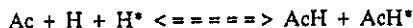
1000

## MÉTODOS INMUNOLÓGICOS DE DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

El desarrollo de las técnicas inmunológicas competitivas de determinación hormonal causó una revolución dentro del mundo de la endocrinología y ha permitido a los distintos grupos de investigadores la comprensión de numerosos procesos fisiológicos, patológicos e incluso farmacológicos desde hace aproximadamente unas tres décadas (Blake y Gould, 1984).

La utilización de estas técnicas inmunológicas para la determinación de esteroides es cada vez mayor a nivel mundial. Blake y Gould (1984) señalan que se incrementa anualmente a razón de 500 a 1.000 millones de análisis.

El principio sobre el que están basadas todas estas técnicas (Yalow y Berson, 1958, 1959, 1960; Abraham, 1969, 1975) es la reacción irreversible entre pequeñas porciones de dos reactivos: las hormonas, que actúan como haptenos y los lugares de unión de los anticuerpos, formándose un complejo antígeno-anticuerpo. En el ensayo, una cantidad fija y limitada de anticuerpo específico (Ac) se hace reaccionar con la correspondiente hormona unida a una sustancia marcadora (H\*) y con la hormona sin marcar (H), contenida en la muestra problema o añadida en cantidades conocidas, de tal manera que la hormona libre y la hormona marcada compiten por unirse a los lugares de unión de las moléculas de anticuerpo:



Después de un período de incubación se realiza la separación de las fracciones libre y unida (separación bound/free) al anticuerpo y la cantidad de hormona marcada se mide en una de estas dos fracciones. Por tanto, podemos decir que la concentración de los lugares de unión del anticuerpo disponible, para que se una la hormona marcada está inversamente relacionada con la concentración de

la hormona, sin marcar, que exista en la muestra.

Estas técnicas inmunológicas son aplicables, en principio, para la determinación de cualquier tipo de sustancia o compuesto, en cualquier fluido biológico (plasma, saliva, leche, orina) sólo es necesario que ésta posea la capacidad de producir anticuerpos específicos en un animal de experimentación (Abraham, 1975). Hoy en día existen anticuerpos disponibles comercialmente para una gran cantidad de compuestos.

Las técnicas inmunológicas poseen unas características especiales:

La sensibilidad que pueden alcanzar es muy grande, situándose en el rango de femtomoles ( $10^{-15}$ ), lo que las hace idóneas para medir las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides, algunas de las cuales se sitúan alrededor del rango indicado. El grado de sensibilidad es dependiente de la avidez o afinidad que posea el anticuerpo por la hormona y los sistemas de detección disponibles para evidenciar o cuantificar esta unión.

La especificidad también es muy elevada, lo que hace posible la discriminación entre los distintos esteroides; esta característica es fundamental en el caso de estos compuestos, puesto que su estructura química es muy similar y pueden interferir en el análisis dando lugar a errores significativos en los resultados.

Otra característica de estos métodos es su repetibilidad, de tal forma que la seguridad y precisión es tan elevada que se minimizan los errores debidos al azar.

Dentro de estas técnicas inmunológicas de determinación las que utilizan los isótopos radiactivos y de entre ellas el radioinmunoanálisis (RIA) (análisis competitivo con hormona marcada en fase líquida) ha sido la estrella, desde que en 1958 Yalow y Berson desarrollasen su ensayo para determinar los niveles de insulina en sangre, puesto que además de las ventajas ya señaladas, los isótopos

radiactivos, producen una señal muy clara y fácilmente detectable, sin que los restantes componentes de la muestra o del entorno interfieran dicha señal (Maggio, et al., 1980; Blake y Gould, 1984.; Munro y Lasley, 1988). Con el RIA se han determinado hormonas esteroides en todas las especies imaginables (tanto vertebradas como invertebradas) y en el hombre.

Las técnicas de analítica inmunorradiométrica (IRMA) introducidas por Miles y Hales (1968) utilizan el anticuerpo marcado con el isótopo radiactivo, unido a una fase sólida, para la determinación de antígenos o anticuerpos. Hay varios tipos (Catty y Raykundalia, 1988):

- **Análisis de inhibición del anticuerpo marcado:** El antígeno (hormona) se adhiere a una fase sólida y la unión con el anticuerpo marcado es inhibida por la presencia de antígeno libre. La fase sólida suele ser: tubos especiales de plástico o placas con pocillos, que se cuentan separadamente. Este tipo de análisis es más sencillo que el RIA y la fase de separación tan compleja de realizar, está sustituida por una de lavado.

- **Análisis Sandwich o de "dos-sitios":** Un primer anticuerpo se adhiere a una fase sólida, a él se une el antígeno y la unión se detecta mediante la adición del mismo anticuerpo específico marcado.

- **Análisis con antiglobulina marcada radiactivamente:** Es similar al anterior, pero el segundo anticuerpo es una antiglobulina marcada.

Estos dos tipos de análisis poseen las mismas características que el primero; sin embargo, no se utilizan en la determinación de hormonas esteroides, debido a que al ser sustancias de un peso molecular muy bajo (200-300), no pueden unirse a dos anticuerpos simultáneamente (Abraham, 1975; Van Weemen y Schuurs, 1976; Munro y Lasley, 1988).

Pero, estas técnicas poseen una serie de graves inconvenientes, puestos en

evidencia por un gran número de investigadores (Schwartz y Van Weemen, 1980; Ruz-Gabany et al., 1981; Blake y Gould, 1984; Tijssen, 1985; Mearn y Lasley, 1988) entre las que podemos citar las siguientes:

- Los isótopos radiactivos que emiten radiaciones gamma poseen una vida media relativamente corta (aproximadamente 2 meses). Además, pueden existir grandes variaciones entre lotes de hormonas marcadas radiactivamente. La señal de los isótopos que emiten radiaciones beta es difícil de registrar y necesita demasiado tiempo. A todo ello hay que añadir, el pequeño número de isótopos disponibles en la práctica.

- Los procedimientos de marcaje de las hormonas con estos isótopos y la realización del RIA, conllevan riesgos no sólo potenciales, sino también reales para la salud, puesto que sus efectos son acumulativos y nocivos.

- La radiación puede causar daños, incluso la destrucción de las moléculas de las hormonas marcadas.

- La separación de las fracciones marcadas unida/libre en el caso del RIA, generalmente implica técnicas laboriosas (precipitación de la fracción libre por el exceso del sustrato activado, florasol, precipitación de la fracción unida por el exceso del doble anticuerpo, con sulfato nátrico, etc.) lo que hace difícil la automatización de esta técnica.

- Por último, el equipamiento necesario para desarrollar esta técnica es considerablemente caro, necesitando un personal altamente cualificado. Además, el uso, distribución y eliminación del material radiactivo generalmente está sujeto a unas medidas de seguridad muy estrictas y a una infraestructura que no todos los laboratorios poseen.

Por todo ello, en las dos últimas décadas, se han desarrollado una serie de inmunoensayos, no marcados, para la determinación de hormonas esteroideas,

sustituyendo los isótopos radiactivos por otras sustancias marcadoras, de tal manera que las técnicas resultantes reuniesen todas las ventajas de las técnicas radiactivas (RIA e IRMA), evitando sus grandes inconvenientes, sobre todo la utilización de la radiactividad. El manejo de aquellas sustancias no implica riesgos para la salud, o éstos son mínimos y se pueden evitar totalmente si se trabaja en las condiciones adecuadas. Estas sustancias poseen una larga vida y su eliminación no plantea más inconvenientes que los de cualquier sustancia química que se utilice en el laboratorio.

Los marcadores no isotópicos más utilizados para la determinación de hormonas esteroides son los enzimáticos, seguidos de los quimioluminiscentes y fluorescentes (Maggio, et al., 1980; Kohen, 1980; Riad-Fahmy et al., 1981; Arakawa et al., 1982, 1983; Kim et al., 1982, 1983; De Boever et al., 1983, 1984, 1986; Bertoft et al., 1984; Blake y Gould, 1984; Tsuji, 1987; Munro y Lasley, 1988). También se han empleado bacteriófagos (Andrieu et al., 1975), coenzimas (Kohen et al., 1978) y últimamente se está incrementando el uso de radicales libres estables, a medida que se va consiguiendo aumentar la sensibilidad de estos sistemas de detección (Munro y Lasley, 1988).

Los enzimoimmunoanálisis (EIA) para esteroides, hicieron su aparición a principios de la década de los setenta con los trabajos de Van Weemen y Schuurs (1971, 1972) para la determinación de estrógenos. Simultáneamente, otro grupo de investigadores (Engvall y Perlman, 1971, 1972) publicaron una variante de estos métodos inmunoenzimáticos que denominaron ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay o ensayo enzimático unido a un inmunoadsorbente), para la cuantificación de IgG de conejo, sistema que ha sido adaptado posteriormente para la determinación de todo tipo de esteroides.

Los enzimoimmunoanálisis han tenido una gran aceptación en todo el mundo, constituyéndose la más clara alternativa al RIA y técnicas afines, al poseer unas características especiales (Tijssen, 1985): sensibilidad, especificidad y detectabilidad muy elevadas. Son unos métodos de análisis muy rápidos y simples.

Su reproducibilidad es sencilla y la evaluación objetiva. Se pueden realizar en pruebas de campo. No existen peligros de radiaciones. Los reactivos son razonablemente económicos y con una vida media larga. La versatilidad de los ensayos puede ser incrementada significativamente por la gran variedad y propiedades específicas de las enzimas. Es posible el uso de los anticuerpos monoclonales, con todas las ventajas que éstos poseen.

Ello ha hecho que a diferencia del RIA, utilizado principalmente en investigación, el EIA desde su aparición haya sido enfocado hacia el diagnóstico práctico, incluso para pruebas de campo, lo que en la endocrinología veterinaria puede ser en ocasiones fundamental (Schuurs y Van Weemen, 1980).

Por otra parte, el EIA abarca un amplio rango de campos, siendo una pieza fundamental en la investigación y clínica de otras Ciencias como Microbiología, Virología y Farmacología (Maggio, 1980; Schuurs y Van Weemen, 1980). Debido a esta diversidad de aplicaciones, existen numerosas clasificaciones propuestas para estos métodos, aunque todas ellas son muy similares:

Una primera clasificación divide a estos métodos en Heterogéneos y Homogéneos (Wisdom, 1976; Van Weemen y Schuurs, 1976, 1979; Engvall, 1980; Oellerich, 1983):

Los EIA Heterogéneos, dentro de los cuales se incluye el ELISA, están basados en los mismos principios que el RIA: después de la formación de los complejos hapteno (hormona)-anticuerpo, es necesaria la separación de las fracciones unida/libre, mediante los métodos adecuados y determinar la actividad de una fracción, o de ambas.

En los EIA Homogéneos (EMIT: Enzyme-multiplied immunoassay technique, Rubenstein et al., 1972) esta separación no es necesaria. El principio del método es similar al de la técnica bacteriófaga modificada y la actividad enzimática está influenciada por la reacción antígeno-anticuerpo; la actividad de

la enzima marcadora se reduce si se produce la unión del conjugado hapteno-enzima al anticuerpo específico. Esto es debido a que el anticuerpo reduce la afinidad del sustrato por el sitio activo de la enzima, bien por un impedimento estérico, por un cambio conformacional de la enzima o imposibilitando los cambios conformacionales necesarios para la actividad catalítica.

Otro tipo de EIA homogéneo (EMIT) está basado en la inhibición de la enzima marcadora por la conjugación al hapteno. La enzima marcadora es reactivada, cuando se produce la unión del conjugado al anticuerpo específico. En ambos tipos de técnicas, la actividad enzimática determinada, dependerá de la concentración de hapteno libre en la muestra, que compite con el conjugado por unirse a una cantidad limitada de anticuerpo específico (Oellerich, 1983). En teoría esta técnica es ideal para la determinación de sustancias de bajo peso molecular, como es el caso de los esteroides; sin embargo, la presencia de contaminantes en la muestra que alteran la actividad de la enzima y su escasa sensibilidad (mg/ml o todo lo más  $\mu\text{g/ml}$ ) hacen que los pocos métodos que han sido presentados hasta el momento no posean unas características que los hagan superiores a los EIA heterogéneos (Dhar et al., 1988). Otra gran desventaja es la señalada por Engvall (1980), ya que al ser la enzima la pieza clave para el desarrollo del EIA homogéneo, se requieren unos amplios conocimientos en enzimología, no requeridos en el caso del EIA heterogéneo.

Schuurs y Van Weemen (1980) clasifican los EIA heterogéneos en tres tipos: Competitivos, inmunométricos y sandwich, siguiendo una clasificación similar a la empleada con el RIA para la determinación de antígenos.

Centrándose en los EIA heterogéneos, Voller (1980) los clasifica en tres tipos, según se empleen para la determinación de antígenos o de anticuerpos:

- EIA de Competición, para la determinación de antígenos o haptenos.
- Técnicas Sandwich, para la determinación de antígenos y haptenos: sencillo



u homólogo ( si se emplea el mismo anticuerpo específico, marcado y sin marcar ) y amplificado u heterólogo ( si el segundo anticuerpo está producido en una especie diferente al primero ).

- EIA indirecto, para la determinación de anticuerpos.

Esta clasificación es poco estricta, pues solamente está referida a los EIA en fase sólida, a los que además se nombra como ELISA, tal y como lo hicieron los primeros autores que pusieron a punto esta técnica (Engvall y Perlman, 1971, 1972).

Clark y Engvall (1960) realizan una clasificación muy rigurosa de las distintas técnicas ELISA. El ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) es una variante del EIA en el que uno de los componentes de la reacción (antígeno o anticuerpo) está adherido o adsorbido a una fase sólida, de una manera similar a las técnicas IFMA, de tal manera que las distintas fases del ensayo están separadas por simples lavados, lo que facilita la posible automatización del método.

Según estos autores, existen dos grandes grupos de técnicas ELISA: Competitivas y No Competitivas.

- Dentro del primer grupo podemos distinguir los análisis en los que el antígeno o hapteno está marcado con la enzima y los que es el anticuerpo el que se conjuga a ésta.

Este ELISA de competición con antígeno (hormona) marcado está basado en el mismo principio que el RIA, con la única variación que el anticuerpo está adherido a una fase sólida y es el que han utilizado la mayoría de los autores para la determinación de hormonas esteroideas (véase cuadros de autores).

- En el segundo grupo diferencian tres tipos de análisis: de un sólo sitio, sandwich o de dos sitios e indirecto para la cuantificación de anticuerpos.

El análisis no competitivo de un sólo sitio sigue unos pasos similares al de competición, pero en este caso el reactivo inmovilizado está en exceso y la incubación de las sustancias libre y marcada no se realiza simultáneamente, sino en fases sucesivas: primero se hace reaccionar la fracción libre y luego se añade la fracción marcada en exceso, para que se una a la fracción adherida, en exceso, a la fase sólida, que no haya reaccionado.

Este tipo de análisis posee un gran potencial que todavía no ha sido explotado en su totalidad, pues se supone que con esta amplificación (exceso de reactivos) se podrá incrementar, aún más, la sensibilidad de estas técnicas inmunológicas de análisis.

Una clasificación un poco más compleja es la aportada por Tijssen (1985) que divide los EIA en:

- EIA de amplificación de la actividad: AA.
- EIA de modulación de la actividad: MA.

Ambos tipos pueden ser homogéneos y heterógenos y competitivos y no competitivos.

Esta clasificación está basada en las limitaciones y los potenciales inherentes de cada método.

En los análisis de AA se utiliza un gran exceso de inmunorreactivos con el fin de obtener la máxima señal posible del compuesto que va a ser analizado, es decir, se amplifica la señal producida.

En los análisis de MA, la cantidad de inmunorreactivos es limitada y depende de la modulación de la señal producida como resultado de la competición de las moléculas problema, sin marcar y las marcadas, por la cantidad fija y limitada de anticuerpo. Los análisis utilizados para la determinación de hormonas

esteroides se encuentran dentro de este grupo: EIA heterogéneo competitivo de MA.

Algunos autores emplean el principio de competición pero de una forma ligeramente distinta: Sadeh et al. (1979) utilizaron un método para la determinación de estradiol-17 $\beta$ , en el que se utilizan dos anticuerpos: el primero (anti-E2) se une a una fase sólida (tubos de poliestireno), después se añade una mezcla compuesta por la muestra a determinar (estradiol libre) y estradiol conjugado a dinitrofenil-lisina (DNP). Se establece la reacción de competición y se forman los complejos E2-DNP/Anti-E2 y E2/Anti-E2. Para ponerlos en evidencia se adiciona un conjugado IgG-anti-DNP/HRP, que se unirá a los complejos E2-DNP/Anti-E2. Después se añadirá el sustrato y se procederá a la lectura de la reacción. La sensibilidad que se alcanza con esta técnica es de 10 pg/tubo, pero su repetibilidad no es constante de unos ensayos a otros (% C.V. inter-ensayos = 33), lo que unido a la complejidad del método hace que no haya vuelto a repetirse.

Elder y Lewis (1985) introdujeron un método inmunométrico en microplaca para la determinación de cortisol y testosterona: en una primera fase se adhiere el esteroide unido covalentemente a una proteína (tiroglobulina), a la fase sólida; en un segundo paso se añade el anticuerpo específico y la muestra problema o las concentraciones estándar de hormona. Finalmente, se añade un segundo anticuerpo, anti-IgG marcado con la enzima. En la literatura existe un precedente muy parecido (Yerde et al., 1980) basado en el sistema peroxidasa-antiperoxidasa que es el encargado de evidenciar el complejo testosterona-anticuerpo, pero el método era muy poco sensible (límite de detección = 100 pg/ml) y complicado de ejecutar, sin que hayan existido publicaciones posteriores.

Prakash et al. (1987) introdujeron la técnica del segundo anticuerpo para la determinación directa de progesterona en plasma bovino. En la primera fase, se adhiere a la fase sólida un anticuerpo anti-IgG, específico para la especie en la que se ha desarrollado el anticuerpo anti-progesterona. En un segundo paso se añaden: la muestra problema o estándar y el conjugado hormona-enzima y después

rápidamente el anticuerpo específico anti-progesterona. Con ello tienden a minimizar los efectos de un mal tapizado de los pocillos de la microplaca, con el anticuerpo específico, produciéndose errores en la estimación de la muestra y a evitar los efectos indeseables producidos por el tiempo que transcurre desde que se añade la mezcla muestra-conjugado, en el primer pocillo, hasta el último, tal y como señalaron Munro y Stabenfeldt (1984).

El método más reciente es el aportado por Meyer et al. (1990). Se trata de un EIA amplificado para la determinación de estradiol-17 $\beta$  empleando el sistema estreptavidina-biotina, con una previa inmuno-cromatografía de afinidad de la muestra. Este método es complicado (tapizado de la placa con el primer anticuerpo - IgG anti-conejo; retapizado con BSA; adición de los estándares - 15-0.12 pg/50  $\mu$ l + muestra + biocitnil-estradiol; estreptavidina-HRP; adición del sustrato; medida a 450 nm) pero sus autores lo señalan como el más sensible conseguido hasta ahora: 120 fg/pocillo y según ellos, el único capaz de determinar las concentraciones plasmáticas de E2 en bovino, tanto en machos como en hembras, de todas las edades y estadios fisiológicos, de una manera fiable.

Otra característica que ha influido en el desarrollo de los EIA para la determinación de hormonas esteroideas, es el concepto de homología y heterología introducido por Van Weemen y Schuurs (1975) para su EIA de estrógenos (E2 y E3). Un método es homólogo cuando se utiliza el mismo derivado esteroide para la producción del anticuerpo específico y para la conjugación a la enzima. En el heterólogo se utilizan dos derivados distintos para el inmunógeno y el conjugado enzimático. Este nuevo concepto se introdujo debido a que el anticuerpo específico, no sólo reconoce antigénicamente la molécula de hormona esteroide para la cual ha sido producido, sino que también existe un reconocimiento antigénico del derivado empleado para la conjugación al portador, con lo cual, la especificidad del método aumenta, pero la sensibilidad disminuye, al presentar el anticuerpo mayor afinidad por el conjugado enzimático que por el esteroide sin marcar y que debe competir con éste en el ensayo para unirse al anticuerpo. Este problema se puede subsanar mediante la introducción de la heterología, que disminuye la afinidad del

anticuerpo por el conjugado enzimático, aumentando por consiguiente la sensibilidad, al permitir una mejor competición con la hormona sin marcar (Abuknesha y Exley, 1978). Van Weemen y Schuurs (1975, 1976), describen tres tipos de heterología: de hapteno, de posición y de enlace. En la heterología de hapteno se utilizan dos haptenos distintos pero relacionados estructuralmente. Este tipo de heterología no ha sido muy utilizada, ya que debido a la química especial de las hormonas esteroides, la sensibilidad de estos métodos no es muy buena (Van Weemen y Schuurs, 1976). En la heterología de posición se utiliza el mismo derivado hapténico pero en carbonos o posiciones distintas ( $\alpha$  o  $\beta$ ). El último tipo de heterología consiste en sintetizar derivados con grupos distintos, bien en la misma posición o en otra diferente. Los tipos de heterología más utilizados han sido los dos últimos, bien sólo o combinados, lo que se ha reflejado en una gran cantidad de publicaciones (véase cuadro).

Generalmente se recomienda la combinación de los dos tipos de heterología, sobre todo para los métodos de determinación de estradiol-17 $\beta$  (Abuknesha y Exley, 1978; Van Weemen y Schuurs, 1979; Riad-Fahmy et al., 1981) en los que es necesaria una gran sensibilidad. Sin embargo, también se han desarrollado una serie de métodos homólogos con unas características similares a los heterólogos en cuanto a especificidad y sensibilidad, (Dray et al., 1975; Tateishi et al., 1977; Sauer et al., 1982 (b); Maurel et al., 1986; Marcus y Durnford, 1988) por lo que se sigue investigando la influencia de este factor en el desarrollo de estas técnicas analíticas. (Sauer et al., 1989 a, b).

Existen una serie de criterios que hay que tener en cuenta para proceder a la puesta a punto de estas técnicas EIA. Estos van unidos a la química especial de las moléculas esteroides, que poseen unas características responsables de varios problemas para desarrollar un análisis inmunológico: son moléculas con una estructura química muy parecida, derivan todas ellas del mismo núcleo de 4 anillos y sólo se diferencian en los grupos funcionales unidos generalmente a los carbonos 3 y 17. En el desarrollo de la mayoría de los análisis inmunológicos competitivos, la molécula esteroide debe ser manipulada no sólo para la formación del

inmunógeno con el que se realizará la producción del anticuerpo específico, sino también para la conjugación a la enzima. Para estas conjugaciones se emplean grupos reactivos que estén presentes en la molécula o los que se introducen artificialmente. La introducción de estos grupos se debe realizar dejando libres los grupos funcionales que son los que determinan la actividad hormonal y la potencia del esteroide (Munro y Lasley, 1988). Por ello, hay que tener en cuenta una serie de criterios utilizados por los distintos autores (Van Weemen y Schuurs, 1976, 1979; Exley y Abuknesha, 1978; O'Sullivan et al., 1979; Maggio, 1980; Clark y Engvall, 1980; Blake y Gould, 1984; Munro y Stabenfeldt, 1984; Tijssen, 1985; Van de Wiel y Koops, 1986; Prakash et al., 1987; Munro y Lasley, 1988; Sauer et al., 1982a y 1989 a, b):

- 1.- Elección del método: EIA o ELISA, método de separación de fracciones, tipo de análisis: homólogo o heterólogo.
- 2.- Producción del anticuerpo específico: elección del inmunógeno, especie animal, método y pauta de inmunización, caracterización del antisuero o del anticuerpo.
- 3.- Elección de la enzima adecuada, elección del derivado esteroide para la conjugación, optimización del método de conjugación, purificación y caracterización del conjugado.
- 4.- Establecimiento de las condiciones del método de análisis: fase sólida, soluciones tampón, tiempos de incubación, diluciones de trabajo de los distintos reactivos, temperatura, pH, etc.
- 5.- Validación del método de análisis y cálculo, evaluación y expresión de los resultados.

## 1.- ELECCION DEL METODO DE ANALISIS: EIA O ELISA.

Está determinada principalmente por dos factores: El método de separación de fracciones unida/libre y la homología o heterología.

Como ya hemos señalado, en los métodos heterogéneos esta separación es necesaria después de la reacción inmunológica, con el fin de detectar y cuantificar la hormona sin marcar. Básicamente existen tres tipos de métodos de separación de las fracciones unida al anticuerpo y libre: método DA o de doble anticuerpo, método DASP o de doble anticuerpo en fase sólida y método de separación en fase sólida más conocido, como ELISA.

En el método DA se incuban la muestra problema, o estándar, junto a una cantidad limitada de anticuerpo específico. Después se añade el conjugado hormona-enzima y se deja reaccionar. Al final de esta incubación se añade un segundo anticuerpo: IgG anti-especie, en la que se produjo el primer anticuerpo, que se une a las fracciones unidas al primer anticuerpo. Se incuba un tiempo más largo (toda la noche). Después se centrifuga, el precipitado se lava dos veces, se redissuelve en la solución sustrato y pasado el tiempo necesario se procede a la lectura de la reacción.

El método DASP es similar, pero en este caso, el segundo anticuerpo está unido a una fase sólida lo que hace más sencilla la precipitación de todo el complejo.

La actividad enzimática puede ser determinada en cualquiera de las dos fracciones (libre o unida). Schuurs y Van Weemen (1980) recomiendan determinarla en la fracción unida por varias razones: se eliminan fácilmente sustancias de la muestra que interfieren en el ensayo, la reacción enzimática se puede llevar a cabo en las condiciones óptimas y, por último, no se necesita una purificación tan estricta del conjugado, de tal manera que aunque exista enzima sin conjugar ésta no altera los resultados, al ser eliminada.

El método de separación en fase sólida (ELISA de competición) es el más utilizado en la actualidad, ya que mediante el volcado o succionado de las distintas fases de la reacción, seguidas de una serie de lavados, se realiza esta separación de fracciones, eliminando totalmente la fase libre.

Una cantidad fija y limitada de anticuerpo específico se fija a la fase sólida. Se realiza un lavado para eliminar el anticuerpo que no haya reaccionado. Se añade una mezcla compuesta por la muestra problema, o estándar, y el conjugado hormona-enzima. Se realizan lavados para eliminar la fracción libre y para eliminar la enzima residual sin conjugar. La fracción unida marcada se determina mediante la adición del sustrato y la lectura de la absorbancia del color desarrollado.

En cuanto al tipo de análisis: homólogo o heterólogo, toda la bibliografía consultada (véase cuadros) no aclara de manera definitiva las ventajas de la elección de uno u otro método, ya que el número de análisis de uno y otro tipo es muy similar, deduciéndose que la elección dependerá, en gran medida, de los derivados esteroides que estén al alcance de cada laboratorio (síntesis propia o comerciales).

## **2.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECIFICOS FRENTE A HORMONAS ESTEROIDES.**

Para la obtención de anticuerpos policlones con una especificidad elevada, requerida para el desarrollo de cualquier tipo de inmunoanálisis, se debe seguir una cuidadosa estrategia de producción y de control de calidad de los anticuerpos (Hurn y Chantler, 1980; Tijssen, 1985; Catty y Raykundalia, 1988).

La producción de anticuerpos específicos frente a sustancias de bajo peso molecular (inferior a 1.000), está basada en los trabajos de Landsteiner de los primeros años de la década de los veinte (revisados en su trabajo de 1946), en los que demostró que dichas sustancias adquieren poder antigénico cuando son conjugadas químicamente a sustancias que lo poseen "per se" (sustancias de elevado



peso molecular, como por ejemplo, proteínas), funcionando como haptenos.

Los primeros intentos de producción de anticuerpos policlonales frente a esteroides se remontan a 1925 con los trabajos de Sachs, et al.. Estos autores, produjeron anticuerpos frente a colesterol en conejos, inmunizando estos animales con una mezcla de colesterol, lecitina y suero porcino. Sin embargo, hasta el final de la década de los cincuenta y principios de los sesenta, no se consiguió producir anticuerpos policlonales frente a esteroides, lo suficientemente específicos como para poder ser utilizados en la cuantificación de estas sustancias. Dos grupos de investigadores, pertenecientes a distintas Universidades Americanas, desarrollaron unos conjugados esteroide-proteína aptos para la producción de estos anticuerpos. Por un lado, el grupo de la Universidad de Columbia: Erlanger et al. (1957, 1959) que adaptaron el método de la mezcla anhidra para conjugar el esteroide a la proteína transportadora (albúmina sérica bovina), a través de los grupos amino de los residuos de lisina. Por otro lado, el grupo de la Universidad McGill: Goodfriend y Schon (1958, 1960 y 1961) que conjugaron esteroides, vía enlaces carbamido, a los residuos de lisina de proteínas transportadoras (albumina sérica bovina, albúmina sérica humana, albúmina sérica de conejo y ovoalbúmina), empleando la reacción de Schotten-Baumann.

Ambos métodos han sido empleados por los distintos autores, siendo el primero el más ampliamente utilizado e incluso mejorado (Dawson et al., 1978).

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales específicos son los mismos para cualquier tipo de técnica inmunológica de determinación de hormonas esteroides (RIA, EIA, etc.).

La producción de estos anticuerpos policlonales está basada en la teoría de selección clonal de Burnet (1959), que explica a nivel molecular y celular, la dinámica de los procesos que tienen lugar "in vivo", durante el proceso de inmunización y que dan como resultado la obtención de anticuerpos altamente específicos para las sustancias frente a las que son producidos.

En síntesis esta teoría se puede explicar de la siguiente manera: un precursor linfocitario se transforma en una estructura Fab de un anticuerpo sin instrucciones procedentes de un antígeno (anticuerpo preformado). Un antígeno que lleva instrucciones específicas para conformar este anticuerpo preformado se combina, al azar, con una estructura seleccionada del anticuerpo (receptor de membrana), produciendo un estímulo específico para el crecimiento y la diferenciación de linfocitos, con la formación de un clon de células secretoras de anticuerpos. La selección y estímulo de las células productoras de anticuerpos, por un antígeno, es una reacción biológica cuyo curso no puede precisarse con antelación. La especificidad del anticuerpo viene por tanto determinada por la selección de un grupo de linfocitos B con los que el anticuerpo sufre una interacción o unión, durante la inmunización. Todavía no ha sido posible desarrollar un método de inmunización convencional que conduzca a la estimulación de un solo clon de linfocitos. Por ello, la afinidad, especificidad y concentración de los anticuerpos, en un antisero policlonal, posee un carácter altamente individual, que se refleja en la elevada variabilidad individual que se produce en los animales sometidos al mismo proceso de inmunización, con la misma sustancia, aunque este efecto se consigue disminuir utilizando el mismo lote de inmunógeno para todos los animales y en todas las inmunizaciones (Forest et al., 1976).

La aplicación práctica de esta teoría a los procesos convencionales de producción de anticuerpos, (Tateishi, 1980) ha dado como resultado la obtención de anticuerpos policlonales con una afinidad muy elevada lo que se ha realizado mediante la activación inespecífica de los clones de linfocitos-B, formadores de anticuerpos de los esteroides, que causen una fuerte reacción cruzada con el esteroide frente al que se está produciendo el anticuerpo.

Dresser (1977), Tijssen (1985) y Catty y Raykundalia (1988) señalan las pautas generales a seguir y los factores básicos que determinan la respuesta inmune para la formación de anticuerpos policlonales específicos, puesto que consideran que este proceso es altamente empírico:

A.- Elección del inmunógeno.

- B.- Elección de la especie animal que va ser inmunizada.
- C.- Proceso de inmunización.
- D.- Titulación del suero.
- E.- Obtención, purificación y almacenamiento de los anticuerpos producidos.
- F.- Caracterización de los anticuerpos (Control de calidad).

#### A.- ELECCION DEL INMUNOGENO:

Esta elección es clave para la obtención de unos anticuerpos con elevada afinidad y especificidad, necesarias para el desarrollo de cualquier método inmunológico de análisis hormonal. Dentro de este capítulo existen una serie de factores que hay que tener en cuenta: naturaleza del inmunógeno, su pureza y su inmunogenicidad relativa; relación de este inmunógeno con el hospedador, forma física del inmunógeno y adyuvantes en los que va a ir incluido.

Como ya hemos señalado anteriormente, las moléculas esteroides no poseen capacidad inmunogénica "per se", al poseer pesos moleculares que oscilan entre 200 y 300, por lo que es necesario conjugadas a proteínas transportadoras, o carrier, actuando en este conjugado como haptenos. La especial química de los esteroides, cuyas moléculas derivan de un mismo núcleo formado por cuatro anillos benzenicos, diferenciándose tan sólo en los grupos funcionales unidos a determinados carbonos (C3 y C17) y en la longitud de la cadena lateral, crea un verdadero problema a la hora de elegir el punto por el que el esteroide va a ser conjugado al portador, puesto que de esta elección van a surgir unos anticuerpos capaces de discriminar perfectamente el esteroide, frente al cual se ha producido la inmunización, de otros muy próximos estructuralmente. Para realizar esta conjugación, la mayoría de las hormonas esteroides deben ser manipuladas, con el fin de sintetizar derivados con grupos químicos reactivos a través de los cuales se pueda efectuar dicha conjugación. Bauminger et al. (1974) describen cuatro puntos esenciales para el diseño óptimo de los derivados esteroides que vayan a actuar como haptenos en la producción de anticuerpos específicos frente a éstos:

• La posición de la molécula esteroide en la que se realiza la introducción del grupo. Lo más sencillo es realizarla en uno de los grupos funcionales de los carbonos 3, 17 y 20, tal y como lo hicieron los primeros autores que produjeron estos anticuerpos (Lieberman et al., 1959; Abraham, 1969; Goodfriend y Schon, 1970; Thorneycroft et al., 1970; Van Weemen y Schuurs, 1972). El resultado fue la obtención de unos anticuerpos poco específicos, que presentaban un gran número de reacciones cruzadas con otros esteroides, debido a que estos grupos (C17 y C20) son puntos de ataque de las enzimas que metabolizan los esteroides, lo que potencia las reacciones cruzadas con los metabolitos esteroides, muy abundantes en los fluidos biológicos (Bauminger et al., 1974). Lindner et al. (1972) señalan que lo mejor es evitar los grupos funcionales de la molécula, que son los que les confieren la actividad hormonal y la potencia de ese esteroide, además, la síntesis de los derivados debería realizarse en una posición remota de estos grupos, lo que es totalmente factible, puesto que aún quedan muchas posiciones en el núcleo esteroide (anillos B y C) y en la cadena lateral (Kellie et al., 1975). Por ello, los distintos grupos de autores han desarrollado distintos derivados hapténicos en diversas posiciones de las moléculas de las hormonas esteroides (C1, C6, C7, C11, C15 y C19) ( $\alpha$  o  $\beta$ ) (véase cuadros de autores), con la obtención de unos resultados muy diversos, aunque en la mayoría de los casos con un aumento de la especificidad de los anticuerpos producidos. En algunas ocasiones, sin embargo, la síntesis de derivados fuera de los grupos funcionales no es sencilla de efectuar y muchos autores han utilizado la posición C3 debido a que está muy alejada de los grupos funcionales del anillo D; además, Exley y Woodhams (1976) indican que la pobre especificidad de los anticuerpos producidos frente a estos haptenos, no depende sólo de la posición, sino del empleo de inmunógenos con un grado de pureza insuficiente, generalmente debido a una síntesis inadecuada, en la que se produce una contaminación con derivados en posición C17. Por ello, y una vez obtenido un inmunógeno con el grado de pureza requerido, muchos autores empleando el C3 han conseguido producir anticuerpos con una especificidad muy elevada (véase cuadros de autores).

• La orientación de la unión del grupo químico reactivo, respecto al núcleo

esteroide, que controla el lado de la molécula expuesto ( $\alpha$  o  $\beta$ ), es otro factor importante en la producción de anticuerpos frente a estas hormonas, tal y como señalan Exley y Woodhams (1976) y Grover y Odell (1977). Estos últimos hacen una revisión sobre el efecto del lugar de derivación y la estereoquímica de los inmunógenos utilizados para la producción de anticuerpos frente a E2, P4 y T, relacionándolas con la especificidad de los mismos. Estos autores indican que los derivados que son coplanares con el núcleo esteroide, es decir, que su orientación espacial está situada en el mismo plano del anillo aromático en el que están unidos, producen anticuerpos altamente específicos, ya que de esta manera, al conjugarla al carrier, la molécula esteroide sobresale más que en los casos en los que se utiliza un derivado acoplado en el plano axial. Derivados coplanares, por ejemplo son: E2-6CMO, E2-11 $\alpha$ HS, T-11 $\alpha$ HS, T-3CMO, P4-11 $\alpha$ HS y P4-3CMO.

• La naturaleza química del puente o enlace de unión y la longitud de este enlace: Esteroide-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-BSA. Este es el llamado "Efecto enlace", que algunos autores postulan como problema clave para el desarrollo teórico y experimental de los métodos de determinación inmunológicos (Franek, 1987), puesto que la unión del esteroide, que actúa como hapteno, a los receptores específicos de superficie de los linfocitos B, puede estar influenciada por una interacción estérica entre el receptor y la porción carrier del inmunógeno. Por ello, los antisueros anti-esteroide están formados por una población de anticuerpos que posee distintas especificidades, y por lo menos, una porción de esa población de anticuerpos reconoce, no sólo la estructura del esteroide, sino también la estructura del enlace o puente de unión. Existen varias teorías para la solución de este problema: Honoda et al. (1986) proponen utilizar enlaces largos en el inmunógeno acortando los del marcador, mientras que Tiefenauer y Andres (1984) recomiendan el acortamiento del enlace en el inmunógeno. Otros autores (Corrie et al., 1980) se inclinan por el uso de una cadena recta en el puente de unión derivado esteroide-carrier y un puente sustancialmente largo y ramificado en el marcador. En estos fenómenos está implicado el uso de la homología y heterología, ya que los autores relacionan el "efecto enlace" no sólo con la estructura del inmunógeno, sino también con la del marcador, en cuanto a la especificidad y sensibilidad de los

métodos inmunológicos de análisis hormonal. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados, tanto a nivel molecular (Franek, 1987) como empírico (Tiefenauer et al., 1989), los resultados son aún confusos, siendo necesario un estudio más profundo y extenso.

Los factores anteriormente revisados afectan a la especificidad de los anticuerpos; sin embargo, hay que tener en cuenta que el proceso de inmunización está influenciado por otras características del inmunógeno que afectan a la intensidad de la respuesta inmune:

- La naturaleza del carrier elegido: la proteína más utilizada ha sido la albúmina sérica bovina (BSA) desde que en 1957 Erlanger et al., desarrollasen sus conjugados esteroide-proteína mediante la conjugación del esteroide a los residuos de lisina presentes en la molécula de BSA. Kellie et al. (1975) aportan una serie de razones para la elección de BSA como carrier: su estructura se conoce con todo detalle, posee un gran número de residuos de lisina (59), se puede adquirir en un estado de gran pureza y, sobre todo, cuando se une al derivado esteroide es un excelente inmunógeno. Se han utilizado también otras proteínas como por ejemplo: albúmina sérica humana (HSA), albúmina sérica de conejo (RSA), ovoalbúmina (OA) (Goodfriend et al., 1961, 1970) y tiroglobulina (TG) (Bauminger et al., 1974; White et al., 1985). De todas ellas, la tiroglobulina es la que presenta un mayor número de grupos amino disponibles para la conjugación, produciendo anticuerpos altamente específicos.

- La incorporación molar del esteroide a la proteína, que va a depender en gran manera de la relación inicial esteroide/proteína, de las características del carrier y del método de conjugación. Como podemos observar en los cuadros resumen, los distintos autores emplean una variedad de relaciones molares iniciales, dependiendo del carrier y del método de conjugación. Sin embargo, tal y como indican Niswender et al. (1973), los inmunógenos que poseen una relación molar inicial esteroide-proteína inferior a 20:1 no poseen características antigénicas lo suficientemente fuertes como para producir anticuerpos de elevada especificidad.

Los derivados (tanto los que componen los inmunógenos, como los de los conjugados enzimáticos) utilizados por los distintos autores, para el desarrollo de las técnicas ELISA para E2, P4 y T se encuentran reflejados en los cuadros resumen de autores.

La formación de esos derivados se puede realizar de varias maneras; generalmente consiste en la introducción de un grupo carboxilo (HOOC) en la molécula esteroide, mediante la formación de ésteres hemisuccinatos (HS) o carboximetil-oximas (CMO) (Erlanger et al., 1957, 1959); también se utilizan glucurónidos y sulfatos; ésto presenta la ventaja de poder analizar directamente los compuestos procedentes del metabolismo de las hormonas esteroides, sin hidrólisis previa (Kellie et al., 1972, 1975; Nambara et al., 1977, 1982; Shimada et al., 1982; Tanaka et al., 1985). Existen una variedad de métodos de conjugación de un hapteno (hormona) a la proteína transportadora o carrier, estos métodos se utilizan también para conjugar derivados esteroides a la enzima, por lo que se revisan en conjunto.

Principalmente se utilizan tres: Método de la mezcla anhidra (Erlanger et al., 1957); Método de la carbodiimida (Sheenan y Hess, 1955) y Método de los ésteres activos de N-hidroxi-succinimida (Anderson et al., 1964). Los dos primeros están basados en la formación de uniones peptídicas, muy estables biológicamente, entre un grupo carboxilo ácido (HOOC) del hapteno y los residuos  $\epsilon$ -amino de los grupos de lisina de la proteína (carrier o enzima).

La formación de las mezclas anhidras de los ácidos se lleva a cabo a baja temperatura, en un solvente orgánico inerte. La reacción se produce en dos etapas: en la primera, se produce la reacción entre concentraciones equivalentes del ácido, un isobutil-cloroformiato y una amina terciaria (triethylamina), formándose la mezcla ácido-anhidra, esta reacción debe realizarse bajo condiciones anhidras. En la segunda etapa, esta mezcla es descompuesta por los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína que va disuelta en agua, con una pequeña cantidad de

solvente orgánico inerte, por lo que los solventes empleados en las dos fases deben ser miscibles, lo que reduce la elección a unos pocos; de entre ellos, el más empleado es la dimetil-formamida (Kellie et al., 1975). Una ventaja de este método es la relativa simplicidad de la síntesis, pero con rendimiento muy variable (1-50%), aunque generalmente es del 20 al 30% (Kabakoff, 1980).

El método de la carbodiimida es el que primero se utilizó para unir los derivados esteroides a BSA (Erlanger et al., 1957, 1959). La reacción de las carbodiimidas con grupos carboxilo para formar uniones amidas también tiene lugar en dos etapas:

En la primera se forma una acil-urea (o-acil-isourea) activada (compuesto intermediario) que en la segunda etapa reacciona, o bien con un grupo amino de la proteína dando lugar a la conjugación deseada, o bien puede formarse una N-acil-urea. Si la reacción se realiza a pH 5,5-6,0 y a una temperatura de 0°C, se consigue la activación del ácido en forma ionizada y se evitan la formación de acil-ureas, que se forman a altas temperaturas (Bauminger et al., 1980).

Las carbodiimidas más utilizadas son las solubles en agua: EDAC y CMC.

Como en el caso de la mezcla anhidra, el rendimiento de la conjugación varía dependiendo del sistema empleado (relación molar inicial y tipo de CDI), pero se sitúa por término medio alrededor del 20% (Kabakoff, 1980).

Sauer et al. (1982) y Blake y Gould (1984) señalan que con el uso de las carbodiimidas puede existir una co-conjugación entre las moléculas de enzima, debido a que las acil-ureas intermediarias son muy inestables y para conseguir la conjugación es necesario trabajar con un exceso continuo de carbodiimida. La mezcla anhidra, por el contrario, elimina esta co-conjugación, puesto que la mezcla anhidra intermediaria sólo se forma en condiciones anhidras. Al añadir la solución acuosa de la proteína, los grupos carboxilo de ésta no pueden formar anhídridos por ellos mismos, prevaleciendo la reacción de los grupos  $\epsilon$ -amino-mezcla anhidra



(Sauer et al., 1982).

El tercer método es una variante del método de la carbodiimida (Anderson et al., 1964; Hosoda et al., 1979). Consiste en la formación de un éster activo del derivado esteroide haciendo reaccionar el grupo carboxilo con N-hidroxi-succinimida y una carbodiimida. Este éster activo se aísla en su forma sólida y se añade a la proteína disuelta en una solución alcalina. Este último método está teniendo una gran aceptación para la formación de conjugados esteroide-enzima, puesto que los autores que lo emplean (véase cuadros de autores) indican que no se produce una pérdida de la actividad enzimática después de la conjugación, se puede disminuir la relación molar esteroide/proteína inicial con el mismo rendimiento post-conjugación, obteniéndose además un 100% de inmunorreactividad. Este método se ha empleado también para la conjugación de glucurónidos de esteroides a BSA (Mattox et al., 1978).

#### B.- ELECCION DE LA ESPECIE ANIMAL QUE VA A SER INMUNIZADA.

Los anticuerpos frente a esteroides se producen generalmente en cuatro especies animales: conejos, ovejas, cabras y ratones. De entre ellas, el conejo ha sido la más utilizada; en esta especie se realizaron los primeros intentos de producir anticuerpos frente a esteroides (Sachs y Klopstock, 1925; Sachs et al., 1935) y como se puede observar en los cuadros resumen, es la elegida mayoritariamente por los autores para la producción de anticuerpos policlonales, debido a las grandes ventajas que posee esta especie frente al resto. Para la elección de una especie hay que tener en cuenta, en primer lugar, las variaciones individuales existentes en la respuesta inmune, por lo que es necesario inmunizar varios animales frente a la misma sustancia, por si se da el caso de que algún animal no produzca la respuesta deseada, o que en el curso de la inmunización sufra algún tipo de "accidente" que de lugar a su eliminación. Por ello, el animal elegido debe ser lo suficientemente grande para obtener un buen rendimiento en cuanto a volumen de plasma o suero, fácil de mantener y manejar (inmunizaciones

y sangrías), resistente a las inmunizaciones y, además, producir un elevado título de anticuerpos en el menor tiempo posible de inmunización (Dresser, 1977; Hurn y Chantler, 1980; Vaitukaitis, 1981; Catty y Raykundalia, 1988). El conejo reúne todas estas características, produciendo anticuerpos policlonales idóneos para ser empleados en las técnicas inmunológicas de análisis hormonal, con una respuesta excelente de IgG específicas, fáciles de purificar, frente a los esteroides más variados, mediante una inmunización a corto y largo plazo, sobre todo utilizando conjugados inmunizantes esteroide-albúmina sérica bovina, altamente antigénicos para esta especie, produciéndose sólo una pequeña fracción de anticuerpos frente a la albúmina. La edad de los animales es otro factor que hay que tener en cuenta, Dresser (1977) señala que se deben emplear animales jóvenes pero ya adultos, sanos y alojados en unas condiciones bajo las que no estén sometidos a ningún tipo de estrés. Los animales recién nacidos o muy jóvenes no son aptos para la inmunización, puesto que no poseen aún la capacidad de producir anticuerpos o poseen una inmunidad pasiva adquirida a través de la placenta o la leche, que interfiere los procesos de inmunización activa. Los animales viejos, poseen una capacidad de respuesta inmune significativamente reducida, por lo que tampoco son aptos para los procesos de inmunización activa. Aunque por regla general no existen diferencias en la producción de anticuerpos entre sexos, en el caso particular de la producción de anticuerpos policlonales frente a esteroides, algunos autores señalan que el sexo de los animales puede influir en la respuesta inmune, por lo que realizan la inmunización frente a hormonas femeninas en machos y frente a hormonas masculinas en hembras, o machos castrados (Wickings et al., 1977).

En el caso de que se necesiten grandes cantidades de anticuerpos se utilizan como productores de anticuerpos policlonales frente a esteroides, ovejas y cabras; pero su mantenimiento es caro y su manejo es más complicado que el de la especie anterior. Se suelen usar en las técnicas en las que se utiliza un segundo anticuerpo (EIA con separación DA o DASP).

Los ratones se utilizan en la producción de anticuerpos monoclonales (Fantl

et al., 1982, 1983, 1984; White et al., 1985). En la producción de anticuerpos policlonales frente a estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona, su uso no está muy extendido porque además de proporcionar muy poca cantidad de suero o plasma por animal, el título que desarrollan no es muy alto (White et al., 1985) y varía enormemente de unas estirpes a otras, factor primordial a tener en cuenta (Catty y Raykundalia, 1988). Para la producción de anticuerpos policlonales frente a testosterona se ha utilizado la estirpe C57BL/6 (Tateishi et al., 1980) y la Balb/c (White et al., 1985).

### C.- PROCESO DE INMUNIZACION.

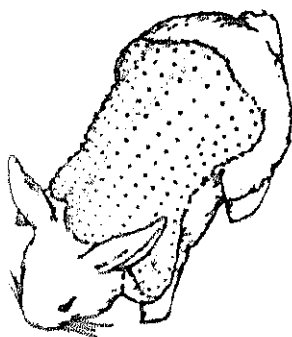
Es muy importante elegir la pauta de inmunización idónea para conseguir un alto título de anticuerpos en el menor tiempo posible. Para ello, se debe decidir la forma en la que se va a administrar el inmunógeno y teniendo en cuenta que hay que utilizar la menor cantidad posible (Dresser, 1977), se debe potenciar su inmunogenicidad, lo que se consigue mediante el empleo de inmunopotenciadores (adyuvantes), eligiendo la ruta más idónea de administración, las dosis y el tiempo adecuados, entre inyecciones y el tiempo total de la inmunización (Catty y Raykundalia, 1988).

La utilización de adyuvantes es esencial en la producción de anticuerpos policlonales frente a esteroides. Los más utilizados son los de Freund (completo e incompleto) (véase cuadros de autores). Estas sustancias son inmunopotenciadores que amplían la respuesta humoral de los inmunógenos, activando uno o más sectores del sistema inmune (Tijssen, 1985). Los adyuvantes de Freund (1942) son de naturaleza oleosa, están compuestos por un aceite mineral y una sustancia estabilizante que lleva incorporada un emulsionante que permite conseguir emulsiones estables entre la fase acuosa (inmunógeno) y la oleosa. El adyuvante completo lleva incorporado una dispersión de *Mycobacterium tuberculosis* (0,5 mg/ml) inactivada por calor. Whitehouse (1977) señala tres efectos muy importantes relacionados con la intensidad de la respuesta inmune producida:

- a) Al ser inyectados (generalmente subcutánea o intradérmicamente) forman unos depósitos, produciendo un desprendimiento prolongado del inmunógeno desde el punto de inyección, consiguiendo un estímulo continuado del sistema inmune.
- b) El adyuvante completo induce la formación local de granulomas asépticos ricos en macrófagos y células inmunocompetentes (monocitos).
- c) Minimizan el efecto tóxico que pueda causar el inmunógeno sobre el animal.

Muchos autores (véase resumen) utilizan, además, otro inmunopotenciador en la primera inmunización, generalmente *Bordetella pertussis* intramuscularmente. Tateishi et al. (1980) desarrollaron un nuevo procedimiento de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales frente a testosterona, con una reactividad muy baja frente a 5 $\alpha$ -DHT, induciendo la tolerancia de los linfocitos B mediante la inyección de la 5 $\alpha$ -DHT conjugada a un copolímero de elevado peso molecular (copolímero de ácido D-glutámico y D-lisina). Este conjugado se une específicamente a los receptores superficiales de los linfocitos B causándoles una tolerancia irreversible frente a esa sustancia, obteniéndose en la inmunización posterior, unos anticuerpos muy específicos frente a testosterona al eliminar prácticamente la reacción cruzada con la 5 $\alpha$ -DHT.

Las vías de administración y las pautas de inmunización son muy variadas, prácticamente cada autor desarrolla una distinta y la señala como la más efectiva (véase resumen). En el caso del conejo, la pauta de inmunización más utilizada ha sido la propuesta por Vaitukaitis et al. (1971) que consiste en la administración de múltiples inyecciones subcutáneas o intradérmicas, de muy pequeño volumen (10-100  $\mu$ l) en el dorso del animal (dibujo 1).



Se ha comprobado que el desprendimiento prolongado del inmunógeno desde varios sitios, produce una mayor estimulación de la respuesta inmune. Dawson et al. (1978) propusieron una pauta de inmunización distinta, mediante la administración intramuscular del inmunógeno (tres dosis cada dos semanas), seguida de inyecciones de recuerdo, o boosters, intravenosas, mensuales, con el sacrificio de los animales en la decimonovena semana. Estas dos pautas de inmunización, con alguna variante según los autores, han sido las más utilizadas en la producción de anticuerpos policlonales frente a esteroides (véase resumen). La duración de la inmunización es un factor que puede determinar la especificidad de los anticuerpos policlonales frente a esteroides (Thornycroft et al., 1970; Walker et al., 1973; Feren et al., 1976; Dawson et al., 1978), ya que se ha observado que las reacciones cruzadas que presenta el anticuerpo producido frente a otros esteroides, aumentan a partir de un cierto tiempo del comienzo de la inmunización (alrededor del sexto-décimo mes), sin que se observe un aumento significativo del título de anticuerpos, aunque no todos los autores están de acuerdo con esta afirmación. Feren et al. (1976) indican que las reacciones cruzadas que presentan los anticuerpos frente a testosterona disminuyen hasta 2-3% a los 11 meses después de comenzar la inmunización.

## **D.- TITULACION DEL ANTISUERO.**

A medida que se va produciendo el antisuero es necesaria su titulación para comprobar si la inmunización se está realizando de forma correcta y si el animal está respondiendo bien a ella. Para ello, se extrae una pequeña cantidad de sangre y se realiza la titulación del antisuero. Generalmente, estas sangrías se realizan diez días después de las inyecciones del inmunógeno, aunque este tiempo es variable (Wickings et al., 1977).

Existen gran cantidad de métodos para realizar la titulación del antisuero, que incluyen las técnicas inmunológicas básicas: reacciones cuantitativas de precipitina o hemaglutinación (Thornycroft et al., 1970), precipitación en geles de Agar (Butler, 1980; Catty y Raykundalia, 1988), pero sin duda, el método más empleado para detectar el título de los antisueros producidos frente a esteroides ha sido el RIA (véase resumen).

Estas titulaciones permiten determinar cuál es el momento idóneo para comenzar la obtención y purificación de los anticuerpos.

## **E.- OBTENCION, PURIFICACION Y ALMACENAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS PRODUCIDOS.**

Una vez alcanzado un título aceptable de anticuerpos, se extrae de los animales, el plasma o suero que contiene los mismos. La frecuencia y volumen de las sangrías está en función de la especie que se haya inmunizado. En el caso del conejo, la sangre se obtiene generalmente a partir de los vasos de la oreja (arteria central o venas marginales), o por punción cardíaca, siempre bajo anestesia. El volumen que se suele obtener en cada extracción oscila entre 20-30 ml/semana y 30-50 ml/cada 2-4 semanas, dependiendo del peso de los animales, aunque en trabajos recientes (Illera et al., 1990) se ha demostrado que se puede extraer un volumen de 50 ml/semana de sangre sin que el animal sufra alteraciones en sus funciones, siempre y cuando se le deje un corto período de recuperación, antes de

practicarle una nueva extracción.

En los ratones se realiza una exanguinación total, siempre y cuando el título haya sido aceptable (White et al., 1985).

En el caso de la oveja no existen problemas en cuanto al volumen de sangre (500-700 ml/mensuales) que se puede obtener, realizándose las extracciones generalmente a partir de la vena yugular (Catty y Raykundalia, 1988).

No todos los autores purifican las inmunoglobulinas contenidas en el suero, muchos de ellos (véase resumen), se limitan a eliminar la pequeña fracción de anticuerpos producidos frente al portador, generalmente mediante una adsorción de éstos (método de Thorneycroft et al., 1970). El resto emplea básicamente tres métodos de purificación: rivanol, precipitación con sulfatos (amonio o sódico) con posterior cromatografía de intercambio iónico o no y cromatografía de afinidad con Sepharosa 4B. La mayoría de los autores eliminan la fracción de anticuerpos producida frente al carrier, mediante una adsorción de los mismos.

Los anticuerpos policlonales frente a esteroides son muy estables y se suelen conservar o bien congelados o liofilizados, siendo este último el método de elección, ya que permite la conservación de los anticuerpos un período más prolongado de tiempo.

#### **F.- CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS (CONTROL DE CALIDAD).**

Este último punto es de suma importancia, puesto que, como ya hemos señalado anteriormente, la química especial de las hormonas esteroides hace que sea indispensable la perfecta caracterización de los anticuerpos policlonales producidos para su utilización en las técnicas inmunológicas de análisis.

El criterio utilizado por la gran mayoría de los autores (por no decir que todos), es el propuesto por Abraham (1969, 1975) que incluye la determinación del título del anticuerpo, la afinidad del anticuerpo por su esteroide y la especificidad del anticuerpo frente a su esteroide y otros próximos estructuralmente. El título de un anticuerpo se puede definir como aquella dilución de antisuero o anticuerpo que une el 50% del esteroide marcado bajo unas determinadas condiciones. Otros autores (Boenisch, 1989) lo definen como la dilución de anticuerpo más alta que resulte óptima para el desarrollo de un método específico.

La afinidad del anticuerpo influye en la sensibilidad del ensayo, puesto que el límite teórico de sensibilidad está determinado por la constante de afinidad. El cálculo de esta constante es complicado y en determinados casos no se puede realizar, ya que es necesario alcanzar el equilibrio termodinámico, lo que no se consigue todas las veces, como por ejemplo en ELISA de competición (Munro y Stabenfeldt, 1984). En estas técnicas se sustituye este parámetro por el "comportamiento o practicabilidad" del anticuerpo en la ejecución del ensayo, que al igual que en la caracterización de los conjugados enzimáticos es el que realmente posee relevancia (Schuurs y Van Weemen, 1980; Blake y Gould, 1984).

La especificidad del antisuero o anticuerpo es un factor determinante para que las características de la técnica puedan ser aplicadas en su totalidad. Abraham (1975) señala, que cuanto más específico sea el método de determinación, el tratamiento previo de la muestra será más sencillo o incluso innecesario, y esto está en función de la especificidad del antisuero o anticuerpo, por el esteroide frente al que ha sido producido. Esta especificidad se determina realizando las pruebas de "reacción cruzada", que consisten en enfrentar distintas diluciones del anticuerpo frente otros esteroides muy relacionados estructuralmente con el esteroide frente al que se ha producido el mismo.

La caracterización de los antisueros o anticuerpos obtenidos, está incluida en la validación de las técnicas inmunológicas de análisis hormonal, de manera que puedan ser utilizados en cualquier laboratorio, bajo las mismas condiciones.



### 3.- ELECCION DE LA ENZIMA ADECUADA.

Esta elección es crítica para una puesta a punto del método en las condiciones óptimas. La enzima apropiada para el desarrollo de un EIA debe reunir las siguientes características (Maggio, 1980; Riad-Fahmy et al., 1981; Blake y Gould 1984; Tijssen, 1985):

- Debe estar disponible con gran pureza a un precio asequible, ser soluble y de fácil preparación.
- Elevada actividad específica: baja  $K_m$  para el sustrato, pero alta  $K_m$  para el producto.
- Debe ser estable y activa bajo las condiciones requeridas para los ensayos (pH, composición de las soluciones tampón, concentración iónica, etc.), especialmente para una buena formación de los complejos antígeno-anticuerpo.
- En su estructura deben existir grupos reactivos a través de los cuales se puedan efectuar los procesos de conjugación: unión covalente con las hormonas, con la mínima pérdida de las actividades enzimática e inmune.
- Los conjugados enzima-hormona deben ser estables largo tiempo bajo las condiciones usuales de almacenamiento.
- El método de análisis para la evaluación del producto de la reacción enzimática debe ser económico, preciso y sensible, preferiblemente espectrofotométrico (end-point) y no estar afectado por factores presentes en la muestra.
- Las enzimas, sustratos y cofactores no deben entrañar riesgos

potenciales para la salud.

- La enzima debe estar ausente de los fluidos biológicos.
- Por último, no deben existir factores endógenos de la muestra que afecten la actividad enzimática.

Las enzimas más utilizadas en los ELIA heterogéneos para hormonas esteroides son: peroxidasa de rábano picante (HRP),  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, penicilinas, ureasa y glucoamilasa. Todas reúnen las características anteriormente señaladas y las suyas propias (composición química, procedencia, sustratos, etc). Bosch et al. (1980); Riad-Fahmy (1981); Oellerich (1983); Blake y Gould (1984) y Tijssen (1985) han realizado unas revisiones muy extensas sobre este tema, detallando las características específicas de cada enzima (naturaleza química, obtención y purificación, propiedades catalíticas y cinética enzimática, sustratos y cromógenos), los métodos para determinar la actividad enzimática y los detalles prácticos sobre la catálisis enzimática y su inhibición (efectos del pH, temperatura etc., sobre el índice de reacción de las enzimas). Sin embargo, hay que señalar que la peroxidasa de rábano picante (HRP) ha sido la enzima más utilizada desde el trabajo pionero de Van Weemen y Schuur (1972) para la determinación de estrógenos (véanse cuadros), quizás debido a su facilidad de conjugación a los derivados esteroides y a la amplia variedad de sustratos y cromógenos que permiten desarrollar técnicas de determinación de la actividad enzimática, sencillas y precisas.

Recientemente, Sauer et al. (1989 a, b) han realizado un extenso estudio comparando el uso de cuatro enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina, penicilinas y  $\beta$ -galactosidasa) en un ELISA heterólogo, en microplaca y directo, para la determinación de progesterona en leche de vaca, relacionando estos conjugados con las condiciones del método y la sensibilidad alcanzada con cada uno de ellos. Sus conclusiones apuntan que las cuatro enzimas son apropiadas para la determinación de progesterona mediante este ELISA bajo las condiciones propuestas, sin

inclinarse definitivamente por una, debido a que todas ellas producen unos análisis lo suficientemente sensibles.

Por otro lado, debe seleccionarse cuidadosamente el derivado esteroide empleado para la conjugación a la enzima. En esta selección influyen varios factores:

- El tipo de análisis elegido (homólogo o heterólogo) (Van Weemen et al., 1975; Exley y Abuknesha, 1977; Kabakoff, 1980; etc.).
- La posición de la molécula esteroide en la que se realiza la introducción del grupo.
- La naturaleza del puente o enlace de unión y la longitud de este enlace: Esteroide-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-enzima; Hosoda et al. (1980, 1985b, 1986), después de realizar una serie de estudios sobre este tema, concluyen diciendo que la sensibilidad de los EIA se puede incrementar utilizando conjugados esteroide-enzima con puentes de enlace más cortos que los utilizados en el inmunógeno. Explican este efecto debido a la existencia de una interacción estérica entre el anticuerpo y la enzima marcadora, que puede ser similar a la que se produce en el proceso de selección clonal en el curso de la inmunización, entre el inmunógeno y el receptor de inmunoglobulinas situado en la superficie de los linfocitos B, sin embargo, indican que seguirán realizando estudios sobre el tema con el fin de determinar mejor la influencia de este factor sobre el desarrollo de otros EIA.
- La incorporación molar del hapteno a la enzima va a depender de la relación inicial esteroide/enzima, de las características de la enzima (nº de grupos disponibles para la conjugación) y del método de conjugación. Tal y como se puede comprobar en los cuadros

resumen, los distintos autores consultados han empleado una amplia variedad de relaciones molares iniciales esteroide/enzima. Para cada enzima, los autores encuentran idónea una relación molar inicial distinta, pero en el caso de la peroxidasa, por ejemplo, se decantan hacia una relación de 20 moles de esteroide/mol de peroxidasa (Van Weemen y Schuurs, 1975; Massey y Ferrua, 1980; Munro y Stabenfeldt, 1984; Marcus y Durnford, 1986; Sauer et al., 1989 a, b). Con ella se obtienen conjugados con bajas incorporaciones molares del esteroide a la enzima (5-1:1), necesarias para que las técnicas presenten una sensibilidad adecuada, ya que una incorporación molar excesiva del esteroide a la enzima no permite que la reacción de competición con el esteroide libre se lleve a cabo en las condiciones adecuadas (Joyce et al., 1978; Sauer et al., 1981 y Munro y Stabenfeldt, 1984).

Los derivados esteroideos y los métodos de conjugación utilizados por los distintos autores, para la formación de conjugados esteroide-enzima y el posterior desarrollo de las técnicas ELISA para E2, P4 y T, se encuentran reflejados en los cuadros resumen. Como se puede observar, la mezcla anhidra ha sido el método de elección para la conjugación de la HRP, mientras que para la  $\beta$ -galactosidasa se han utilizado, fundamentalmente, las carbodiimidas.

La purificación y caracterización del conjugado son dos puntos muy importantes para obtener un rendimiento óptimo de esta conjugación.

Dos son los métodos más empleados para la purificación de estos conjugados:

- Diálisis exhaustiva, cromatografía de exclusión molecular en gel con Sephadex G-50 y ultracentrifugación de gradiente de densidad (Van Weemen y Schuurs, 1972, 1975, 1976). Con la combinación de estas tres técnicas, estos autores consiguen eliminar tanto el derivado esteroide como la fracción de la enzima que

no se ha conjugado.

- Diálisis exhaustiva y cromatografía de exclusión molecular en gel o gel-filtración, con distintos tipos de geles: Sephadex G-25, Sephadex G-50, Sephadex G-75 y Sephadex G-200. Este método es el más utilizado (véanse cuadros) pues permite eliminar totalmente el derivado esteroide que no se haya conjugado, lo que es totalmente necesario, puesto que éste puede interferir posteriormente el análisis. Con este método no es posible separar la enzima que haya quedado sin conjugarse, pero como ya hemos señalado antes (Munro y Stabenfeldt, 1984), si el método de separación de fracciones es adecuado, esta eliminación no es necesaria. Sin embargo, algunos autores (Abuknesha y Exley, 1978) estiman necesario realizarla y completan esta purificación con una cromatografía de afinidad (Sephacosa 4B).

Por último, la caracterización de estos conjugados se debe realizar teniendo en cuenta unos parámetros básicos:

- La incorporación molar del esteroide a la enzima. Con ella se determina el rendimiento de la conjugación.

Tres son los métodos más empleados: método espectrofotométrico de Erlanger et al. (1957); método de Habeeb (1966), modificado por Fields (1971) que consiste en la determinación de los grupos amino libres de la enzima antes y después de la conjugación y determinación por RIA. Los tres métodos han sido ampliamente utilizados (cuadros resumen) y aunque existen autores (Munro y Stabenfeldt, 1984) que se decantan hacia el último, todos son válidos.

- La actividad enzimática de la enzima antes y después de la conjugación. Se realiza generalmente determinando la misma concentración de enzima conjugada y sin conjugarse, enfrentándola a

los sustratos y cromógenos idóneos y calculando posteriormente el porcentaje de actividad enzimática después de la conjugación. Existen varios métodos para las distintas enzimas, algunos de los cuales han sido adaptados a microplacas, entre ellos destacamos los siguientes: McComb y Bowers (1972) para fosfatasa alcalina; Exley y Abuknesha (1978) para  $\beta$ -galactosidasa; Novick (1962) para penicilinasa, Joyce et al. (1977) para peroxidasa; Sauer et al. (1981) para  $\beta$ -galactosidasa; Van de Wiel et al. (1982, 1986) para peroxidasa y Sauer et al. (1989, a) para las cuatro enzimas mencionadas.

- Comportamiento o practicabilidad de estos conjugados en el desarrollo de los EIA: este último criterio junto con el primero es uno de los determinantes para una buena puesta a punto de una técnica EIA, en él se determina la unión del conjugado al anticuerpo y la sensibilidad, repetibilidad, precisión y exactitud del método (Schuurs y Van Weemen, 1980). Munro y Stabenfeldt (1984), señalan como una referencia práctica, el alcanzar una lectura de absorbancia de 0,6 - 1 compatible con una buena sensibilidad, basada en la adición de una serie de concentraciones de hormona sin marcar.

#### 4.- ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DEL METODO DE ANALISIS:

Este punto lo hemos ido revisando a lo largo de las condiciones que se deben tener en cuenta para la puesta a punto de los distintos métodos EIA; sin embargo quedan algunas cuestiones que puntualizar. Maggio (1980) y Burrels y Dawson (1982) señalan unas pautas básicas a seguir:

- En los ELISA, un factor importante a tener en cuenta es la fase sólida. Existe una amplia variedad de fases sólidas disponibles. El material más utilizado ha sido el poliestireno que sirve para la inmovilización tanto de anticuerpos como de antígenos. Se usa en

forma de: tubos de ensayo (Sadeh, 1979), bolas o esferas (Guison, et al., 1978), cubetas (Ellens y de Leeuw, 1977), y microplacas de 96 pocillos (adaptado por Voller y Bidwell, 1975). Las microplacas son las más utilizadas por los distintos autores (cuadros) y Burrells y Dawson (1982), recomiendan las de fondo plano con el fin de evitar errores de lectura de absorbancias. También se han utilizado otros materiales como polivinilo, pero con resultados más desiguales (McLaren et al., 1981). Con las microplacas, la unión del antígeno o anticuerpo a la misma se realiza mediante adsorción (Maggio, 1980).

Para los métodos DASP, se han utilizado como fases sólidas la Sepharosa 4B y la celulosa microcristalina, o una combinación de ambas (cuadros). La unión del antígeno o anticuerpo a este tipo de fases sólidas es covalente, e implica un procedimiento de conjugación previo un poco más complicado.

Como se puede comprobar en los cuadros resumen, las condiciones de adsorción de los antígenos y anticuerpos a la fase sólida son también muy variables:

El volumen (50  $\mu$ l - 300  $\mu$ l).

La concentración de antígeno o anticuerpo que se adsorbe, generalmente en el caso de las proteínas (anticuerpos) y utilizando como fase sólida microplacas de poliestireno (cargado negativamente) se emplea una concentración que varía de 0,5 - 1  $\mu$ g/pocillo con el fin de conseguir una única capa de proteína adsorbida a estos pocillos. Por encima de estas cantidades, la adsorción de proteínas se realiza probablemente mediante interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, no se debe utilizar una cantidad de proteína muy elevada, ya que ello da lugar a interacciones proteicas que lo único que producen es un gasto inútil sin que se consiga un incremento de la sensibilidad del ensayo (Blake y Gould, 1984).

Las técnicas de adsorción son también muy variables y cada autor señala la suya como la más conveniente. Estas técnicas varían en las soluciones tampón empleadas, en la temperatura y en el tiempo de incubación. La solución tampón

más empleada es carbonato-bicarbonato 0,05 M de pH = 9,6 (Burrels y Dawson, cuadros resumen). Otros autores, como Sauer (1982), señalan que la adsorción de los anticuerpos a la fase sólida se realiza en condiciones óptimas utilizando una solución tampón de acetato de pH = 5. Marcus y Durnford, (1986) adsorben las inmunoglobulinas a pH = 4, señalando que para su ensayo, estas condiciones son las óptimas al incrementar notablemente la sensibilidad. Coll et al. (1988), indican que la dilución de las inmunoglobulinas en agua destilada o desionizada, reduce las reacciones de fondo, inespecíficas. La temperatura y los tiempos de incubación más empleados son las siguientes (Burrels y Dawson, 1982; Coll, 1988): 16 horas a 4°C, 16 horas a temperatura ambiente, 16 horas a 37-40°C, 3 horas a 37-40°C y 30 minutos a 37°C.

Algunos autores emplean un retapizado con una solución tampón que lleva incorporada una proteína, con el fin de evitar la adsorción inespecífica de la enzima, o la muestra, en las fases posteriores del ensayo (Sauer et al., 1982; Van de Wiel et al., 1982, 1986). Marcus y Hackett (1986) van aún más lejos, al señalar que un retapizado de 2 horas a 4°C con una solución tampón (PBS, pH = 7) que lleve incorporado el 1% de albúmina sérica bovina (BSA), es imprescindible para un óptimo desarrollo de las etapas posteriores del método.

La reacción de competición también se desarrolla en las condiciones más variadas. Son factores importantes: las soluciones tampón empleadas, el pH al que se lleva a cabo la reacción, el volumen de los distintos reactivos (volumen de muestra en relación con el volumen de conjugado), la temperatura y el tiempo de incubación.

Van Weemen y Schuurs (1972) recomiendan la utilización de soluciones tampón que lleven una concentración 0,01M de fosfato, para impedir la adsorción inespecífica del conjugado enzimático a la fase sólida. Las soluciones tampón así como el pH (5-7) varían según la enzima empleada. El tiempo de reacción generalmente es de 2 a 3 horas en los sistemas que emplean como fase sólida las microplacas, en los otros varía según el método de separación empleado (DA,



DASP). La temperatura es otro factor importante, tanto en la reacción de competición, como en la reacción enzimática, en la que incluso llega a ser un factor limitante. Por supuesto, está en función de la enzima empleada: en el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y penicilinasas se emplean temperaturas de 40 a 45°C, con la peroxidasa las reacciones se realizan a temperatura ambiente (20-22°C), sin que se sobrepasen los 24°C, puesto que por encima de esta temperatura se observa una disminución de los valores de absorbancia muy significativa (Zarco, 1988). Marcus y Hackett (1986) señalan que el rendimiento de la reacción de competición se incrementa notablemente cuando se realiza a 4°C, observándose un aumento en la repetibilidad y precisión de la técnica.

Otro factor que hay que tener en cuenta para el establecimiento de las condiciones del ensayo, es el tiempo que transcurre al dispensar los distintos reactivos en la reacción de competición (solución tampón, muestras y conjugados), desde el primer al último pocillo. Este factor ha sido estudiado por numerosos autores (Manro y Stabenfeldt, 1984; Marcus y Hackett, 1986; Van de Wiel et al., 1986; Zarco, 1988) y todos señalan que no debe ser superior a los 6-8 minutos, puesto que con tiempos superiores se observan variaciones muy significativas en los resultados obtenidos en los últimos pocillos, con una disminución en los valores de absorbancia, lo que conlleva un error en la cuantificación de las muestras. Prakash et al. (1987), han desarrollado un método ELISA empleando dos anticuerpos con lo que la influencia de este factor desaparece.

Los sustratos, cromógenos, soluciones tampón, pH, temperatura y tiempos de la reacción enzimática son también muy variables. Prácticamente, cada autor emplea unas condiciones distintas siendo este un punto que se deberá desarrollar en cada laboratorio, con la práctica.

Por último, los lavados que separan las distintas fases del ensayo y con los que se realiza la separación de fracciones libre/unida, son también importantes. Las soluciones de lavado son muy variadas, pero casi todas ellas llevan incorporado algún tipo de detergente no iónico y una determinada carga iónica, con el fin de

eliminar perfectamente los reactivos que no hayan reaccionado y para evitar las reacciones inespecíficas de fondo. Estos lavados se realizan por inmersión, o por dispensación mediante pipetas especiales (multicanales) o lavadores automáticos de la solución de lavado, que se elimina por aspiración o volcado de las microplacas o tubos (Burrells y Dawson, 1982). Los tiempos de lavado varían de 30 segundos a unos minutos y el número de lavados de 3 a 5, aunque cada autor emplea el que cree más conveniente.

La preparación, o manipulación, de las muestras a analizar, para la realización del análisis estará en función de si el método es directo o necesita una extracción previa, también dependerá del tipo de muestra y de la hormona a analizar. Como se puede observar en los cuadros resumen, la tendencia, en los últimos, años ha sido desarrollar métodos directos para la determinación de hormonas esteroideas, exceptuando el caso del estradiol-17 $\beta$ , que por encontrarse en concentraciones ínfimas en el plasma de la mayoría de las especies animales, requiere una extracción previa, con el fin de disminuir todas las sustancias plasmáticas que puedan interferir el ensayo (Meyer, 1990).

Actualmente, existen sistemas comerciales de ELISA en tubo, completamente automatizados, con kits de algunas hormonas esteroideas disponibles (Boehringer Mannheim).

#### **5.- VALIDACION DEL METODO ELISA, CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS:**

Los métodos de validación de los EIA son los mismos utilizados para cualquier tipo de análisis cuantitativo. Como parámetros básicos de validación de cualquier tipo de EIA se emplean los siguientes:

- Especificidad.
- Precisión/imprecisión, reproducibilidad y errores.

- Exactitud/inexactitud.
- Detectabilidad, límite de detección y sensibilidad.

Las definiciones de estos parámetros, y la forma de determinarlos, han sido recogidas por Abraham (1975); Cekan, (1975); Exley y Abuknesha (1978); Van Weemen y Schuurs (1979); Maggio, (1980); Burrels y Dawson (1982); Tijssen (1985); Van de Wiel et al. (1986) y Catty y Raycundalia (1988).

El cálculo y expresión de resultados está en función del método empleado. Tijssen (1985) y Catty y Raycundalia (1988) realizan una exhaustiva revisión de las distintas formas de calcular y expresar estos resultados, dependiendo del tipo de método empleado. Actualmente, la mayoría de las casas comerciales han desarrollado unos softwares que vienen junto con los lectores de placas o espectrofotómetros, cuyo manejo en la mayoría de los casos es sencillo, abarcando todas las opciones necesarias para el cálculo y expresión de los resultados (cálculo de concentraciones hormonales en las unidades requeridas, trazado de curvas estándar y rectas de regresión, etc.).

En los cuadros resumen se han revisado los distintos métodos EIA empleados para la determinación de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona. En ellos se encuentran reflejados: los distintos derivados esteroides empleados para la conjugación y el inmunógeno, el método de conjugación, la enzima empleada, la incorporación molar del esteroide a la enzima o al carrier, el tipo de análisis (homólogo o heterólogo), la separación de las fracciones unida/libre, los sustratos y cromógenos empleados, la especie en la que han sido producidos los anticuerpos, el fluido biológico en el que han sido determinadas estas hormonas y la especie, la extracción previa de la muestra o el análisis directo de la misma y los límites de detección y sensibilidad, así como la precisión de las distintas técnicas (% C.V.), los métodos de purificación del conjugado y el anticuerpo, los procedimientos de inmunización y la especificidad de los anticuerpos o antiseros.

EIA PARA ESTRADIOL-17 $\beta$ 

AUTOR Y AÑO	ENZIMA	MET. CONJUGACION	DER. ESTEROIDE CONJUGACION	E.M.I. EQG/EST	MET. PURIFICACION CONJUGADO	INCORPORACION MOLAR CONJUGADO	SUSTRATO	CRÓMÓGENO	FLUIDO BIOLÓGICO
VAN WEEBEN Y SCHUURS, 1972	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	E2-17 $\beta$ -17HS	DE 5 A 40 : 1	U.O.D., DIALISIS, GEL FILTRACION (G-30)	—	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	AC. 5 AS	—
VAN WEEBEN Y SCHUURS, 1973	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	E2-17 $\beta$ -17HS E2-17 $\beta$ -17HO 11= OH-E2-17 $\beta$ -17HS 11= OH-E2-17 $\beta$ -17HO	—	U.O.D., DIALISIS, GEL FILTRACION (G-30)	—	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	AC. 5-NH <sub>2</sub> HIDROXI BENZONCO	—
VAN WEEBEN Y SCHUURS, 1976	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	11= OH-E2-17 $\beta$ -11HS E2-17 $\beta$ -17HS 11= OH-E2-17 $\beta$ -11HO	DE 5 A 10 : 1	U.O.D., DIALISIS, GEL FILTRACION (G-30)	—	—	—	—
ARIKUNESHA Y EXLEY, 1978	$\beta$ -GALACTOSIDASA	CARBODIMIDA	E2-17 $\beta$ -6-CMO	DE 20 A 1.380 : 1 (MEJOR: 100 : 1)	DIALISIS, GEL FILTRACION (G-25), C.A.	ESPECTRO U.V., RIA 1,7 : 1	p-NPG	—	PLASMA HUMANO
EXLEY Y ARIKUNESHA, 1978	$\beta$ -GALACTOSIDASA	CARBODIMIDA	E2-17 $\beta$ -6-CMO	—	DIALISIS, GEL FILTRACION (G-25)	HIDROLISIS + RIA 1,7 : 1	p-NPG	—	PLASMA HUMANO
SADEN et al., 1979	PEROXIDASA	MET. APTAMEAS (GLUTARALDEHIDO)	<sup>14</sup> C-DNP	—	GEL-FILTRACION (G-200)	ESPECTRO U.V. 0,749 : 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,01%)	AC. 5 AS	SUERO
MAUREL et al., 1986	$\beta$ -GALACTOSIDASA	MEZCLA ANHIDRA	E2-17 $\beta$ -6-CMO	—	—	—	4=U-6-D-0	—	PLASMA, VARIAS ESPECIES ANIMALES
DIAR et al., 1988	LISOZIMA GLUCOSA-4P-DNH	ESTER N-H-S	E2-17 $\beta$ -3-CME	—	DIALISIS, GEL FILTRACION (G-25)	RIA 1 <sup>a</sup> ENZ: 4 : 1 2 <sup>a</sup> ENZ: 12 : 1	1 <sup>a</sup> ENZ: M. LYSODEMITIKUS 2 <sup>a</sup> ENZ: GLUCOSA-4P + NAD	—	—



AUTHOR(S) NAME	GENUS	HOST ORGANISM/TISSUE	ANAL. TECHNIQUE/COMPARISON	REL. CONCENT	ANAL. PREPARATION/COMPARISON	EXPOSURE/DOSE/MOLAR CONCENTR	DIET/AGE	CHROMOPHORE	PLASMA BROMINEN
WAKABAYASHI, Y. ET AL. (UNPUBLISHED, 1988)	PERIDINIA	MUSCLE & ADRENAL	EL-430 G-1700	25-4	SUBSTRATE, EXPL. FRACTIONATION (HPLC)	2000 0.5-1	M <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15.3%	ANFS	DIETARY BROMINEN
MATTHEWS ET AL., 1985	PERIDINIA	OSTEAL TISSUE	10-6000 SYSTEM, EL. DISTILLATION/EXTRACTION	—	HPLC	1-1	M <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	FLUO	PLASMA BROMINEN

# EIA PARA PROGESTERONA

AUTOR Y AÑO	ENZIMA	MEZ. CONJUGACIÓN	DEL ESTERÓIDE CONJUGACIÓN	SOL. IND./EXT.	MEZ. PURIFICACIÓN CONJUGADO	INCUBACIÓN MOLAR CONJUGADO	SUBSTRATO	CRÓMÓGENO	PLASMA BIOLOGIZ.
DAVY et al., 1975	β-GALACTOSIDASA	CARBOHIDRIDA	11α-OH-PN 11MS	---	DIALISIS, GEL FILTRACIÓN (0-25)	---	MFNOLAL (RMP)	---	PLASMA (RATAS GESTANTES)
KOYCE et al., 1977	PEROXIDASA	MEZCLA AMIDRIDA	11α-OH-PN 11MS	---	DIALISIS, GEL FILTRACIÓN (0-25)	65 : 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OPD	PLASMA (HUMANOS)
URON et al., 1980	β-GALACTOSIDASA	ESTER N-H-S	11-PH-MS	DE 5 A 40 : 1 (MEJOR: 10 : 1)	GEL FILTRACIÓN (0-25)	RIA 1 : 1	o-NPD	---	PLASMA
NAKAO, 1980	β-GALACTOSIDASA	CARBOHIDRIDA	11α-OH-PN 11MS	---	DIALISIS, GEL FILTRACIÓN (0-25)	---	o-NPD	---	SÉRUM (BOVINO)
ARNSTADT Y LEERS, 1981	PEROXIDASA	MEZCLA AMIDRIDA	11α-OH-PN 11MS	---	GEL FILTRACIÓN (0-25)	RIA + 1 : 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OPD	LECHE (BOVINO)
SAUER et al., 1981	β-GALACTOSIDASA	ESTER N-H-S	11α-OH-PN 11MS	2000 : 1	DIALISIS, GEL FILTRACIÓN (0-25)	RIA 800 : 8,00	o-NPD	---	LECHE (BOVINO)
NAKAO et al., 1982	β-GALACTOSIDASA	CARBOHIDRIDA	11α-OH-PN 11MS	---	DIALISIS, GEL FILTRACIÓN (0-25)	---	o-NPD	---	LECHE (BOVINO)
SAUER et al., 1983	β-GALACTOSIDASA	ESTER N-H-S	11α-OH-PN 11MS 11-PH-MS 11α-OH-PN 11OLUC PN 3CMO	250 : 1 25 : 1	DIALISIS, GEL FILTRACIÓN (0-25)	---	o-NPD	---	LECHE (BOVINO)
VAN DE WIEL Y SCOFFS, 1983	PEROXIDASA	---	4β-OH-PN 4MS	---	---	---	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OPD	PLASMA Y LECHE (BOVINO)

AUTORES Y AÑO	ENZIMA	MEZ. INTERMEDIARIA	MEZ. INTERMEDIARIA CONCENTRACION	MEZ. INTERMEDIARIA	MEZ. INTERMEDIARIA CONCENTRACION	MEZ. INTERMEDIARIA CONCENTRACION	MEZ. INTERMEDIARIA CONCENTRACION	MEZ. INTERMEDIARIA CONCENTRACION	MEZ. INTERMEDIARIA CONCENTRACION
YOUNG y KOPPELMAN, 1960	PEROXIDASA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	—	EN MEZCLA FILTRACION (20-25)	—	$H_2O_2$	—	EN MEZCLA (BIOFILTRACION)
MILLER y WILSON, 1961	PEROXIDASA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	20 : 1	EN MEZCLA FILTRACION (20-25)	20 : 1	$H_2O_2$	—	PLASMA Y EN MEZCLA (BIOFILTRACION)
MILLER y WILSON, 1961	PEROXIDASA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	20 : 1	EN MEZCLA FILTRACION (20-25)	20 : 1	$H_2O_2$	—	PLASMA Y EN MEZCLA (BIOFILTRACION)
BAKER et al., 1966	PEROXIDASA ALCALINA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	20 : 1	EN MEZCLA FILTRACION (20-25)	—	$H_2O_2$	—	EN MEZCLA (BIOFILTRACION)
YOUNG y KOPPELMAN, 1960	PEROXIDASA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	—	—	—	$H_2O_2$	—	PLASMA Y EN MEZCLA (BIOFILTRACION)
WIMPEY et al., 1966	PEROXIDASA	—	—	—	—	—	$H_2O_2$	—	EN MEZCLA (BIOFILTRACION)
MILLER et al., 1967	PEROXIDASA ALCALINA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	20 : 1	EN MEZCLA FILTRACION (20-25)	20 : 1	$H_2O_2$	—	PLASMA (BIOFILTRACION)
PRASAD et al., 1967	PEROXIDASA ALCALINA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	—	—	—	$H_2O_2$	—	PLASMA (BIOFILTRACION)
BAKER et al., 1967	PEROXIDASA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	—	—	—	$H_2O_2$	—	EN MEZCLA
SALZER et al., 1969	PEROXIDASA ALCALINA	MEZCLA INTERMEDIARIA	EN MEZCLA	20 : 1	EN MEZCLA FILTRACION (20-25)	—	$H_2O_2$	—	EN MEZCLA

AUTOR Y AÑO	ENZIMA	MET. CONJUGACION	PER. EFFEROMORF. CONJUGACION	REL. DMS/RES	MET. PURIFICACION CONJUGADO	INCORPORACION MOLAR CONJUGADO	SUBSTRATO	TIPO DE REACCION	PLANTA DONDE SE OBTUVO
SAUER et al., 1969	POSFATASA ALC. β-GALACTOSIDASA PENICILINASA PEROXIDASA	ENTER N-4 S MEZCLA ANHIDRA	11α OH-P4 15MS 11α OH-P4 15OLUC 11α OH-P4 15OH P4 3C40	20-2 : 1 MEZCLA 20-25 : 1	DIALISIS, OSL FILTRACION (5-25)	---	p-NPP p-NPO PENICILINA V H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	---	LACRIS
RECHT et al., 1969	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	6L-P4 6MS 11α OH-P4 15MS	---	OSL, FILTRACION (10-25)	---	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	TMS	LACTAR (BOVINO)



# EIA PARA TESTOSTERONA

AUTOR Y AÑO	ENZIMA	MET. CONJUGACION	INH. ESTERONA CONJUGACION	R.M.I. (mg/EST)	MET. PURIFICACION CONJUGADO	INCORPORACION MOLAR CONJUGADO	SUBSTRATO	CONJUGADO	PLASMA ANALIZADO
MANOWSKI et al., 1977	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	T XMO	10 : 1	DIALISIS	RIA 3.3 : 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AL : 5 AS	PLASMA
TATSUSHI et al., 1977	GLUCOSAMINASA	CARBODENIDA	T XMO	---	DIALISIS, GEL FILTRACION (G-25)	---	---	---	SUERO (HOMBRE)
BERICH et al., 1978	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	11-OM-T HRS	---	---	---	PEROXIDO DE H2O2	OPD	---
RAJANOWSKI et al., 1978	PURKINIDASA	MEZCLA ANHIDRA CARBODENIDA	T XMO	---	DIALISIS, GEL FILTRACION (G-25)	RIA 1 <sup>ra</sup> MET. 5x 2.7:1 2 <sup>a</sup> MET. = 6.25 : 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AL : 5 AS	PLASMA (HOMBRE, MUJER)
VORDE et al., 1978	PEROXIDASA (IMP. ANTES 1gO CONJUGO)	---	T XMO	---	---	---	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	o-DIANISIDINA	SUERO (HOMBRE, MUJER)
KISSI et al., 1979	PEROXIDASA	CARBODENIDA	T XMO	---	DIALISIS	---	PERH. ELNA V	ALBUMIN/VODIO	SUERO (HOMBRE, MUJER)
TURNER et al., 1979	PEROXIDASA	MEZCLA ANHIDRA	11-OM-T HRS	---	DIALISIS, GEL FILTRACION (G-25)	1.2 : 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OPD	PLASMA, SALIVA (HOMBRE)
NOSCHEN et al., 1980	o-GALACTOSIDASA	ESTER H-H-S	4-OH-MGLUTARICIL- 4-OH-S-T-4-OH T XMO 17-O HRS-T 4-OMTS-T 4-CARBONETIL-17O-T	15 : 1 30 : 1 60 : 1	---	---	o-NPD	---	---

AUTORE Y AÑO	ENZIMA	MET. CONJUGACION	REA. ESTERONIDE CONJUGACION	S.M.I. ENSAYO	MET. PURIFICACION CONJUGADO	INCORPORACION MOLAR CONJUGADO	SUBSTRATO	CONDICIONES	PLASMA ANALIZADO
KESSE et al., 1963	PEROXIDASA	CARBOHIDRADA	Y XMO	—	—	—	PERACELINA V	ALMIDON/NUOH	PLASMA Y SUERO
PIERRE Y LEWIS, 1965	PEROXIDASA	—	NO ANTICOMEX	—	C. A.	ESPECTRO UV	—	—	PLASMA Y SUERO
MURRAY et al., 1965	PEROXIDASA B-GALACTOSIDASA	ESTER N-ES-S CARBOHIDRADA	4-OM- ARABINOLITANOL	INIF 8-GAL 15:1 5:1 10:1 10:1 30:1 15:1 60:1 60:1	DIALISIS	ESPECTRO UV.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4-4-D-D-O	—
MAKHSY V (DURNFORD), 1966	PEROXIDASA	MEZCLA AMIDADA	T XMO	20:1	DIALISIS, GFL FILTRACION	RIA 0.17:1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ABTS	SUERO VARIAS ESPECIES d. v

# EIA PARA ESTRADIOL-17 $\beta$ (Cont.)

AUTOR Y AÑO	YAPLEADO ANTI T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /BUFFER	R. COMPETICION T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /BUFFER	VOLUMENES ( $\mu$ l) ANTI + CONJ/MUEST.	RET/MOM	EXTRAIDO/DIRECTO	SEPARACION (FASE SOLIDA)	LIMITE DETECCION SENSIBILIDAD 50%	% CV <sub>2</sub> INTRA / INTER	% RECUPERACION
VAN WEEMEN Y SCHUURS, 1972	—	—	—	HOMOLOGO	—	DASP (CELULOSA)	L.D.: 0.1 ng/ml	—	—
VAN WEEMEN Y SCHUURS, 1975	1 <sup>ra</sup> ANTE: 30 MIN. 2 <sup>a</sup> ANTE: 2 HORAS POSFATO 0.1 M, pH=6 T.A. (20-22°C)	30 MIN. T.A. (20-22°C) POSFATO 0.1 M, pH=6	100 - 300/100	HOMOLOGO HETEROLOGO	—	DASP (CELULOSA)	5.30% HOM: > 1.000 ng/ml HET: 0.8 - 5 ng/ml	—	—
VAN WEEMEN Y SCHUURS, 1976	1 <sup>ra</sup> ANTE: 30 MIN. 2 <sup>a</sup> ANTE: 2 HORAS T.A. (20-22°C)	30 MIN. T.A. (20-22°C)	100 - 300/100	HOMOLOGO HETEROLOGO	—	DASP (CELULOSA)	5.30% HOM: > 1.000 ng/ml HET: 2 - 8 ng/ml	—	—
ABUQHESHA Y EXLEY, 1978	1 <sup>ra</sup> ANTE: 1 HORA A 37°C, 30 MIN. A 4°C 2 <sup>a</sup> ANTE: 2 H. A 37°C O 16 H. A 4°C POSFATO 0.06M	1 HORA A 37°C 30 MIN. A 4°C POSFATO 0.06M	100 - 100/100	HOMOLOGO HETEROLOGO	EXTRAIDO	D.A.	= 25 pg/ml	—	—
EXLEY Y ABUQHESHA, 1978	1 <sup>ra</sup> ANTE: 1 HORA A 37°C, 30 MIN. A 4°C 2 <sup>a</sup> ANTE: 2 H. A 37°C O 16 H. A 4°C POSFATO 0.06M	1 HORA A 37°C 30 MIN. A 4°C POSFATO 0.06M	100 - 100/100	HETEROLOGO	EXTRAIDO	D.A.	20 - 300 pg	—	—
SADEN et al., 1979	24 HORAS A 4°C CARBONATO, pH=9.5	90 MIN. A 37°C 90 MIN A 20-22°C PBS, pH=7	1,300 - 300/300	SANDWICH	EXTRAIDO	VOLCADO/LAVADO (TUBOS POLYST.)	L.D.: = 10 pg/tubo	7.7-15.9 / 7.5-33	85 - 95
MAUREL et al., 1980	16 HORAS A 4°C CARBONATO, pH=9.5	60-90 MIN. A 37°C	—	HOMOLOGO	—	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 0.1 pg/pocillo	2.5-8.1 / 0.7	—

AUTORES Y AÑO	TAPICADO ANTE Y/YT/RESURVER	8. COMPRESION Y/YT/RESURVER	MELEJANES (m) AMN - COMU/RESURVER	RES/RESUR	EXTRAIDO/RESURVER	EXTRAIDO/RESURVER (PASE SOLERA)	LD: 300 pg/mole	% CM: 100% (PASE)	% RESURVER
SHAR, et al., 1988	LYE 2 H A 37°C FOSFATO 0.8M pH=6.2 GORDA: 2 M A 37°C YRES, pH=8	LYE 2 H A 4°C FOSFATO 0.8M pH = 6.2 GORDA: 30 MIN A 4°C, YRES, pH=8	LYE 100 - 100/30 GORDA: 30 - 100/30	EXTRAIDO	---	NO SE HACE	LD: 300 pg/mole	67.61 (---	---
MARCUS Y DUNN, 1988	34 HORAS A 4°C PBS, pH=7.2 RESURVERADO CON BSA 2 H A 4°C	2 HORAS A 4°C PBS + 0.1% BSA	300 - 100/30	RESURVER	EXTRAIDO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	LD: 0.75 pg/pedillo R. 50%: 13.3 pg/pedillo	2.7-5.1/3.4-5.9	---
MEYER et al., 1988	1° ANTE 2 H A 22°C CARBONATO 0.1M pH=6.3 2° ANTE 10 H A 64°C	15 MIN. A 64°C FOSFATO 0.8M +0.1% BSA pH = 7.2	100 - 30/30	HETEROLOGO	EXTRAIDO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	LD: 0.17 pg/pedillo ± 50%: ±0 pg/pedillo	2.5-6.1/6.7	---

# ISA PARA PRIMESTERINA (Cont.)

AUTOR Y AÑO	EXTRACCION ANTES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA EXTRACCION
ORLEY et al., 1972	30 MIN. A 30-32°C FOSFATO pH=7 (1ª Y 2ª ANTE)	30 MIN. A 30-32°C FOSFATO pH=7	100 - 100/100	HOMOLOGO	EXTRAIDO	D.A.	L.D. 10-15 pg/tubo	---	---
ACERBI et al., 1972	40 MIN. A 30°C CON ALAMBICADO 0,1M pH=9,5	40 MIN. A 30-32°C FOSFATO 0,1M pH=7	200 - 100/100	HOMOLOGO	EXTRAIDO	A.S.P. (SEPARADORA)	5-10% 10 pg/ml	14,7/11-18	---
CHEN et al., 1968	30 MIN. A 4°C (1ª Y 2ª ANTE)	15 MIN. A 4°C	100 - 100/100	HOMOLOGO	EXTRAIDO	D.A.S.P. (BOLAS VIBRANTES)	L.D. 10 pg/tubo 5-10% 1,10-1,60 mg/l	4-12,8-21	---
NAKAGAI, 1968	1ª ANTE: 3 H A 20°C FOSFATO 0,1M pH=7 2ª ANTE: 16 H A 4°C	3 H A 20-32°C FOSFATO 0,1M pH=7	100 - 100/100	HOMOLOGO	EXTRAIDO	D.A.	L.D. 10 pg/tubo 5-10% 25 pg/tubo	4,7-6,7/6,7-9,6	10,1 ± 11,4
ARMSTRONG Y L. J. HARRIS, 1961	30 MIN. A 37°C, 1 H A 4°C PBS/BSA pH=7,4	PBS/BSA pH=7,4	200 - 200/200	HOMOLOGO	EXTRAIDO	A.S.P. (CÉLULOSA)	L.D. <0,05 pmol/tubo 5-10% <1 pmol/tubo	4,8-7,7/7,6-9,2	25-40
SALIER et al., 1961	3 HORAS A 37°C CARBONATO 0,1M pH=9,6	2 HORAS A 37°C FOSFATO 0,1M pH=7	200 - 100/100	HOMOLOGO	DIRECTO	ASPIRADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D. 5 pg/tubo	4,7	---
NAKAGAI et al., 1962	1ª ANTE: 30 MIN A 30°C 2ª ANTE: 16 H A 4°C FOSFATO 0,1M pH=7	30 MIN A 20-32°C FOSFATO 0,1M pH=7	100 - 100/100	HOMOLOGO	EXTRAIDO	D.A.	L.D. 10 pg/tubo	0,5-4,9/6,7-7,5	---

AUTORE Y AÑO	EXPERIADO AMPL Y/Y/BUFERR	2. COMPRESION Y/Y/BUFERR	VOLAPNESES CUB AMPL - COM/PAPEL	HET/HOM	EXTRAIBO/DIRECTO	SEPARACION (PAPE SOLIDA)	LIMITE DETECCION microplastico ppm	% CUB. por 1000 / 10000	% RECUPERACION
SAUER et al., 1988	3 HORAS A 40 °C ACETATO 1 mM pH = 5	2 HORAS 40°C PBS pH = 7	200 - 10/200	HOMOLOGO HETEROLOGO	DIRECTO	ASPERADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 5 pg/pedida 2. 30%: 20-80 pg/pedida	—	—
VAN DE WIEL Y KOOPS, 1982	20 HORAS A 4°C BICARBONATO 0,05M pH = 6,6 RETAPLIZADO: BLA	4 HORAS A 20-22°C	—	HETEROLOGO	DIRECTO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 1-3 pg 2. 30%: 1,5-14 pg	—	—
MURPHY Y STANDHPELDT, 1984	16 HORAS A 4°C CARBONATO 0,05M pH = 6,6	3 HORAS A 20-22°C PBS pH = 7	100 - 50/50	HETEROLOGO	EXTRAIDO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 0,25 pg/pedida	4,9-10,5/8,7-14,3	—
MARBLE Y MACKERTY, 1986	16 HORAS A 4°C PBS 0,1M pH = 7	2 HORAS A 4°C PBS 0,1M pH = 7	50 - 20/50	HETEROLOGO	DIRECTO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 0,3-1,8 pg/pedida	0,8-2,1/5,6-12,3	—
SAUER et al., 1988	3 HORAS A 20-22°C ACETATO 0,17M pH = 3	3 HORAS 20-22°C FOSFATO 0,1M pH = 7	200 - 10/200	HETEROLOGO	DIRECTO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 5 pg/pedida 2. 30%: 24 pg/pedida	4,3-7,9/14,8	—
VAN DE WIEL Y KOOPS, 1986	16 HORAS A 4°C BICARBONATO 0,05M pH = 6,6	2 HORA A 20-22°C PBS 0,06M pH = 7,2	100 - 100/25	HETEROLOGO	DIRECTO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	L.D.: 0,4 pg/pedida 2. 30%: 1,5-3 pg/pedida	3,3-17,6/14,8-36	95
WIMFY et al., 1988	3 HORAS A 22°C PBS pH = 7	3 HORAS A 22°C PBS pH = 7	500 - 300/100	HOMOLOGO	DIRECTO	VOLCADO/LAVADO (A.S.P./PAPEL)	—	—	—

AUTOR Y AÑO	TEMPERADO AMBI- ENTAL/TEMPER	U. TEMPERATURA E/CENTRAL/TEMPER	VOLUMEN DE AGUA (LITROS/LITROS)	MET/METRO	SUBSTRATO/DIRRECTO	PREPARACION (RAPE SOLIDA)	EXPERIMENTACION MICROPLACA/PLA	% C.V. (MOMA) /MATER	% INCREMENTACION
METTERMAN et al., 1980	2ª ASES: 16.14 A 17°C 3ª ASES: 16.12 A 17°C PESADO: 0.004 pH = 5.3	6 HORAS A 17°C PESADO: 0.004 pH = 5.3	100 - 100/100	METROLOGICO	EXTRACCION	D-A	1.12: 0.10 pg/celula	2.06-4.20/1.82-9.21	88.3
POURKASH et al., 1987	2ª ASES: 16.14 A 17°C ENCUENTRO: 0.004 pH = 5.3 RECAPAZADO: 0.004 PESADO: 0.004	1 HORAS A 17°C 10 HORAS A 17°C PESADO: 0.004 pH = 5.3	100 - 100/100	METROLOGICO	DIRRECTO	VOLCANO/LAVADO (MICROPLACA)	1.12: 0.10 pg/celula 5.10%: 1.10 pg/celula	1.12: 0.10/1.14-8	---
SALEH et al., 1987	1. ASES: 16.14 A 17°C pH = 5.3, 16.14 A 17°C	1. ASES: 16.14 A 17°C pH = 5.3 1.14: 16.14 A 17°C	100/25.30	MONOLITICO	DIRRECTO	VOLCANO/LAVADO	---	---	---
SALIM et al., 1988	3 HORAS A 17°C ACETATO 0.17M pH = 5	3 HORAS A 17°C PBS pH = 7.2 4 HORAS A 20.22°C	200 - 10/200	METROLOGICO	DIRRECTO	VOLCANO/LAVADO (MICROPLACA)	5.10%: 10 pg/celula	---	---
SALIM et al., 1989	3 HORAS A 17°C ACETATO 0.17M pH = 5	3 HORAS A 17°C PBS pH = 7.2 3 HORAS A 20.22°C	200 - 10/200	METROLOGICO	DIRRECTO	VOLCANO/LAVADO (MICROPLACA)	5.10%: 17.01 pg/celula	---	---
REITZ et al., 1990	---	---	---	MONOLITICO METROLOGICO	DIRRECTO	(MICROPLACA)	L.D. (HOM): 12 pg/poc L.D. (HET): 0.3 pg/poc 5.10% (HOM): 10 pg/poc 5.10% (HET): 4 pg/poc	NONE 1.14/1.14-1.14 HET 1.14/1.14/1.14	---

# EIA PARA TESTOSTERONA (Cont.)

AUTOR Y AÑO	TAMIZADO ANTI T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /BUFFER	S. COMPETICIÓN T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /BUFFER	VOLUMENES (μl) ANTI - CONJUGADO	DET/ROM	EXTRAÍDO/DIRECTO	SEPARACIÓN (FASE SÓLIDA)	LÍMITE DETECCIÓN SENSIBILIDAD 50%	% CV: INTRA /INTER	% RECUPERACIÓN
RAJKOWSKI et al., 1977	18 HORAS A 4°C 3 HORAS A 20-22°C POSFATO pH=6.5	3 HORAS A 20-22°C POSFATO pH=6.5	200 - 200/200	HOMÓLOGO	---	A.S.F. (CELULOSA)	L.D.: 30pg/ml	---	---
TATERSH et al., 1977	1 <sup>ra</sup> ANTE: 2 H A 20°C PBS pH=7.2 2 <sup>a</sup> ANTE: 16 H A 4°C	2 HORAS A 20-22°C PBS pH=7.2	200 - 200/200	HOMÓLOGO	EXTRAÍDO	D.A.	L.D.: 0.25 ng/ml	11.3/12	---
BOSCH et al., 1978	1 <sup>ra</sup> Y 2 <sup>a</sup> ANTE: 30 MIN Y 1 H A 20-22°C	30 MIN 20-22°C	100 - 300/300	HOMÓLOGO HETERÓLOGO	---	D.A.F.	200 pmol/l	---	---
RAJKOWSKI et al., 1978	1 <sup>ra</sup> ANTE: 2 H A 20°C PBS pH=7.2 2 <sup>a</sup> ANTE: 16 H A 4°C	2 HORAS A 20-22°C PBS pH=7.2	200 - 200/200	HOMÓLOGO	EXTRAÍDO	D.A. DISTINTAS CELULOSAS	S. 30%, 2.5 ng/ml	3.2/-	---
VORDE et al., 1978	---	18 HORAS A 4°C CARBONATO	200 - 300/300	---	EXTRAÍDO	P-AP T.3C340-SEPHAROSA	L.D.: 100 pg/ml	---	---
JOSE et al., 1979	1 <sup>ra</sup> ANTE: 3 H A 20°C 2 <sup>a</sup> ANTE: 36 H A 4°C POSFATO 0.1M pH=7	3 HORAS A 20-22°C POSFATO pH=7	100 - 300/100	HOMÓLOGO	EXTRAÍDO	D.A.	L.D.: 10-15 pg/ml	6.3/2-10	85-105
TURKES et al., 1979	30 MIN A 20-22°C PBS pH=7.4	16 HORAS A 4°C PBS pH=7.4	100 - 100/100	HOMÓLOGO	EXTRAÍDO	ASP (SEPHAROSA)	L.D.: 4pg/ml	7.5-13.7/-	---



EXTRACTO Y AUTOR	EXTRACCION ANTES DE LA PREPARACION	DE LA PREPARACION DE LA PREPARACION	EXTRACCION DESPUES DE LA PREPARACION	EXTRACCION	EXTRACCION DESPUES DE LA PREPARACION	EXTRACCION (FASE FINAL)	EXTRACCION DESPUES DE LA PREPARACION	EXTRACCION DESPUES DE LA PREPARACION	EXTRACCION DESPUES DE LA PREPARACION
EXTRACTO DE AL. 1997	1 <sup>er</sup> ANTE: 0.15 A 4°C 2 <sup>o</sup> ANTE: 0.15 A 4°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	4 EXTRACTOS A 4°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	100 - 100/100	EXTRACTO DESPUES DE LA PREPARACION	---	S.A.	1.0 - 2.0 pg/1000	---	---
EXTRACTO DE AL. 1998	10 EXTRACTOS A 4°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	2 EXTRACTOS A 4°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	100 - 100/100	---	EXTRACTO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	1.0 - 2.0 pg/1000	1.0 - 2.0 pg/1000	10 - 100
EXTRACTO Y EXTRACTO DESPUES	1 <sup>er</sup> ANTE: 10-15 A 4°C 2 <sup>o</sup> ANTE: 2.0 A 10°C pH = 7.3	1 <sup>er</sup> ANTE: 10-15 A 4°C 2 <sup>o</sup> ANTE: 10-15 A 4°C pH = 7.3	100 - 100/100	---	EXTRACTO	S.A. VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	1.0 - 2.0 pg/1000	1.0 - 2.0 pg/1000	10 - 100
EXTRACTO DE AL. 1999	1 <sup>er</sup> ANTE: 4 M A 4°C 2 <sup>o</sup> ANTE: 10-15 A 4°C pH = 7.3	4 EXTRACTOS A 4°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	100 - 100/100	EXTRACTO	---	S.A.	1.0 - 2.0 pg/1000 1.0 - 2.0 pg/1000	---	---
EXTRACTO Y EXTRACTO DESPUES	10 EXTRACTOS A 4°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	2 EXTRACTOS A 10-15°C EXTRACCION DESPUES pH = 7.3	100 - 100/100	EXTRACTO DESPUES DE LA PREPARACION	EXTRACTO	VOLCADO/LAVADO (MICROPLACA)	1.0 - 2.0 pg/1000	1.0 - 2.0 pg/1000	10 - 100

# PRODUCCION DE ANTICUERPOS

AUTORES Y AÑO	IMUNIZACIONES (R.M. E. / CARREROS)	DET. INC. MOLAR	ADYUVANTES	ESPECIE ANIMAL	MEZ. IMMUNIZACION	SANGRES	PURIFICACION	ESPECIFICIDAD (> 99% E.C.)	TITULO
LINDNER et al., 1972	E2 6CMO:BSA (2R1) P4 6CMTE:BSA (202) 11a OH-P4 1045:BSA (2R1)	BSA	ACF	CONEOS P CARRAS P	5-15 mg/MSC 3 mg/SC 1 x SEM/4 SEM 1 BOOSTER/6-7 SEM	SEMANALES (2ª SEM): CONEOS SEMANALES (2ª SEM): CARRAS	---	FREQUENCIA: 100 P4 6CMO: 1/5,000 (12,000) P4 6CMTE: 1/9,000 P4 11HS 1/20,000 (BSA)	
RILEY et al., 1972	T 6CMO:BSA (17:1) P4 6CMO:BSA (25:1)	ESPECTRO UV.	ACF	CONEOS P KZW	2 mg SC/PM 1/14 DIAS 1 BOOSTER (3 mg)	10 DIAS POST INJUN 3 SEMANAS DESPUES BOOSTER	----	T 6CMO: 5=DHT 80 P4 6CMO: 280HPL37 FREQUENCIA: 100% 48	T 6CMO: 1/4,000 P4 6CMO: 1/3,000 (BSA)
BAUMHOFF et al., 1976	T 1CMTE:BSA (3R1) T 1CMTE:TO (1R1) T 1CMTE:BSA (3R1) T 1CMTE:TO (1R1) P 6CMTE:BSA P 1CMTE:BSA P 11HS:BSA E2 6CMO:BSA	ESPECTRO UV. 4º GRUPOS NH <sub>2</sub> BSA	ACF	CONEOS	1 mg/MSC 1 BOOSTER/MES	---	----	T 1:705=DHT 15 T 2:BSA:5=DHT 43 P4 6CMTE: FREQUENCIA: 100% 38 P4 1CMTE: FREQUENCIA: 100% 11 E2 6CMO: 6a OH-E2 178:100 6 CETO-E2-178:80	BSA

# PERMEACION DE ANTICUERPOS FRENTE A ESTERILIZANTES

AUTOR Y AÑO	MONITOREADO (N.º E. - CANTIDAD)	DETE. DEL ANTICUERPO	ADYUVANTE	ESPECIE ANIMAL	DETE. DE INFECCION	SUBSTRATO	PERMEACION	EXPERIMENTAL (N.º E. - CANTIDAD)	RESULTADO
FRANKLIN Y AYO et. 1970	ES 170 INFECCION ES 170 ANTICUERPO	—	ALF	CONEJO	1 mg/100 SC 1 x SEM/4 SEM BOOSTER a 6 MESES 1 mg/100 SC 1 x SEM/4 SEM BOOSTER a 12 MESES	10-14 DIAS POST BOOSTER 10 DIAS POST 2º BOOSTER/INFECCION	STAVANOL ADEL. ANTICUERPO	ES 170E: ES 10-100 ES 170E: ES 10-100 ES 170E: ES 10 ES 170E: ES 10	ES 170E: 1,10-100 ES 170E: 1,10-100 ES 170E: 1,10-100 ES 170E: 1,10-100
ROLEY et al. 1970	ES 170 INFECCION (100%)	ESPECTRO ELV	ALF	CONEJO P. CAL.	4 mg/100-0 SC BOOSTER 2mg 10-100	10 DIAS POST P BOOSTER	STAVANOL ADEL. ANTICUERPO	ES 170E: ES 10-100 ES 170E: ES 10-100	1,10-100-10-100 N/A
VAN WAGENEN Y et. MILLER, 1970	ES 170 INFECCION (100%)	ESPECTRO ELV 100%	ALF	CONEJO	2 x 1,25 mg/SC/2 SEM 1 x 1,25 mg/IV	1 SEM POST INFECC.	—	ES 170E: 100 ES 170E: 100 ES 170E: 10 ES 170E: 10-100	—
WALKER et al. 1970	ES 170 INFECCION	ESPECTRO ELV	ALF	CONEJO P. F.	1 mg/100 SC BOOSTER 2mg 10-100	5-6 DIAS POST BOOSTER	SO <sub>2</sub> DNH <sub>2</sub> ADEL. ANTICUERPO	ES 170E: 100 ES 170E: 100	1,10-100 N/A
WRIGHT et al. 1970	ES 170 INFECCION (100%)	FLUORESCENCIA FLUORESCENCIA	ALF	CONEJO P.	2 mg/SC BOOSTER 2mg 10-100	10-14 DIAS POST BOOSTER	STAVANOL ADEL. ANTICUERPO	ES 170E: 100 ES 170E: 100 ES 170E: 10 ES 170E: 10-100	1,10-100 N/A
DAN SKILLANDER et al. 1970	ES 170 INFECCION (100%) ES 170 INFECCION (100%) ES 170E	ESPECTRO ELV 100%	ALF	CONEJO	1 x 0,25-1,25 mg/SC/2 SEM BOOSTER 1,25 mg IV	1 SEM POST BOOSTER	—	ES 170E: ES 10-100 ES 170E: ES 10-100	ES 170E: 1,10-100 ES 170E: 1,10-100 N/A

AUTOR Y AÑO	PREPARACIÓN (R.M. E : CARBONO)	DET. INC. MOLAR	ADYUVANTE	ESPECIE ANIMAL	WET. INMUNIZACIÓN	SANGRAS	FERTILIZACIÓN	EXPERIMENTACIÓN (n por R.C.)	TÍTULO
NAMURA et al., 1974	E2 4000-BSA (20:1) 1:2 6000-BSA (20:1) E2 7000-BSA (20:1)	ESPECTRO U.V.	ACF	CONEXO 4	2 mg MISC./1 x 3 SEM BOOST: 1 mg ED/ MES	10 DIAS POST INMUNIZACIÓN	---	E2-176: 100	1/1,000-1,000 RIA
VAN WESSEMEN Y M. HUIJERS, 1975	E2 1100-BSA (20:1) E2 1100-BSA (20:1)	ESPECTRO U.V. TINIS	ACF	CONEXO	1 x 20mg/MISC 3 x 0.25 mg/ED 1 x 0.25 mg/IV	---	---	---	---
COLLAV Y W. J. HUIJERS, 1976	E2 1100-BSA (10:1)	RIA	ACF PERTUSSIS	CONEXO	2 mg/MISC	---	---	---	---
VAN WESSEMEN Y M. HUIJERS, 1976	E2 1100-BSA E2 1100-BSA	---	---	CONEXO	---	---	---	---	---
ABUNDHESHA Y EXLEY, 1978	E2 4000-BSA (14:1) E2 3000-BSA	---	ACF	CONEXO CAL.	4 mg/SC/ED/MES BOOSTERS: 1 mg	10 DIAS DESPUES 2º BOOSTER	RYANOL ADE. ANTI-BSA	E2 4000: 100 + CETO E2-176: 136	1/3,200
DAWSON et al., 1978	E2 1100-BSA (20:1)	ESPECTRO U.V.	ACF PERTUSSIS	CONEXO GIGANTE 4, 9	3x20mg/ED/AL/SEM BOOSTERS: 1.25 mg/ IV/12, 24 Y 36 SEM 1 x 20mg/MISC (90) BOOST: 20mg/IV/ 16 Y 24 SEM.	1-3 SEM POST BOOSTER  TODA INMUNIZACIÓN	---	RI	1/9,000-10,000 (12 Y 32 SEM) 1/1,000 (22 SEM) RIA (DASIV)
EXLEY Y ABUNDHESHA, 1978	E2 3000-BSA (10:1)	---	ACF PERTUSSIS	CONEXO	2 mg/MISC	---	DIALISIS	---	1/3,200
SADANI et al., 1979	E2 4000-BSA (20:1)	ESPECTRO U.V.	ACF PERTUSSIS	CONEXO	2 mg/ED BOOST: 24 MOTES	3º MES	30 mg/ml <sub>2</sub> DEAD ADE. ANTI-BSA	---	---

ACTOR Y APO	INDICACION QUE E : CAMBIO	DET. DE. MODAL	ADVERTENCIA	EFECTU. AMBON	DET. INDICACION	SEÑALAS	PRESERVAION	ENTRADA DEAP 10 000 000	TITULO
MELLENZ et al. 1988	ES 10 100	---	---	---	---	---	SO 1000000	---	---
MELLENZ et al. 1988	ES 1000000 0000	---	---	---	---	---	SO 1000000 DEALANS C.A.	---	---
MELLENZ et al. 1988	ES 10000	---	---	---	---	---	SO 1000000 ADE AMT-SEA	ES 1000000 ES 10000 10	1/10000
MELLENZ et al. 1988	ES 1000000 ES 10000	---	---	---	---	---	SO 10000 DEALANS	ES 1000000 10	---

# PRODUCCION DE ANTICUERPOS FRENTE A PROGESTERONA

AUTOR Y AÑO	ENMAREGADO (RM, E: CARRIER)	DET. INC. MOLAR	ADYUVANTE	ESPECIE ANIMAL	MET. ENMAREGACION	SANGRES	PURIFICACION	ESPECIFICIDAD (% 10% S.C.)	TITULO
SANKISAKI et al., 1975	36-CH-P4 3C-MORISA (22:1) 17-CH-P4 3C-MORISA (19:1)	ESPECTRO U.V.	ACF PERTUSSIS AUF	CONEXO NOV	100 µg/MESC BOOSTER: 100 µg/ 6-12 SEM 300 µg/6-12 SEM 2 mg/10-24-32 SEM	6 SEM POST 2º BOOST	—	—	10-CH-P4: 1/10.000 17-CH-P4: 1/20.000 RIA
NISWENDER, 1975	P4 3C-MORISA (14:1) P4 11C-MISA (34:1) 11-CH 11T-MORISA P4 3C-MORISA (20:1) P4 3T-MORISA (20:1) 65 P4 61S-MISA (20:1) 6- P4 61S-MISA (22:1)	ESPECTRO U.V.	ACF	CONEXO	1º G: 0,20 mg 2º G: 1,20 mg 3º G: 3,20 mg 3 x 3 SEM/MESC	2 SEM DESPUES 2º INMUNIZACION	—	TODOS ALTA CON: 5- PREGNANDIONA (13-40) 11-CH-P4 (13-34)	1/400-30.000 P4 3C-MO-MUY BAJO RIA
DRAY et al., 1975	11-CH-P4 11S-MISA (20:1)	—	ACF PERTUSSIS	CONEXO	1 mg/MESC BOOST: 4,2 mg/SC	SEMANALES	—	DEHIOCORCICOST: 10	1/40.000
JOYE et al., 1977	11-CH P4 11S-MISA	—	—	CONEXO	—	—	—	11-CH-P4: 200 110 CH-P4: 200 5- PREGNANDIONA 42	1/6.000
DEVAL et al., 1980	70 P4 70C-MORISA 70 P4 70C-MORISA (20-25:1)	ESPECTRO U.V.	ACF PERTUSSIS	CONEXO	MESC	24 SEMANAS	—	5- PREGNANDIONA 17-25	P4 70: 1/5.000-11.000 P4 70: 1/3.000-9.000 RIA
CHARLES et al., 1980	11- P4 11S-MISA	—	—	CONEXO	—	—	—	45 CH-P4: 20	—

DATE AND TIME	PROJECT/RESEARCH	TYPE OF MATERIAL	ANALYSIS	ANALYST'S NAME	NAME OF ORGANIZATION	ADDRESS	PHONE NO. (if any)	COMPENSATION (if any)	TOTAL
1955-1956	1st RESEARCH	---	---	---	---	---	---	PAID RESEARCHER 21.40	1,000.00
VAN DER WERF et al. 1951	2nd RESEARCH	---	---	LUNEL	---	---	NO. 100	5th RESEARCHER 21.40	---
MILNER & STANFORD, 1954	1st RESEARCH	2nd	ACF PERFECT	LUNEL	1 mg/MSK 23-4 SEM BOKSE 1 mg/3 SEM	2nd 10	NO. 100, 21 AND 100-25	5th RESEARCHER 21.40	1,500-2,000
MILNER & STANFORD, 1954	1st RESEARCH	---	ACF	LUNEL	2 mg/1 4 0 SEM 2 mg/1 100/1 100	---	NO. 100, 21 AND 100-25	5th RESEARCHER 21.40	1,500.00
VAN DER WERF 1951	2nd RESEARCH	---	---	LUNEL	---	---	---	5th RESEARCHER 21.40	1,000.00
MILNER & M. 1950	1st RESEARCH	---	ACF	LUNEL	1 mg/MSK 21 MES	3 MES	---	5th RESEARCHER 21.40	---
PHILIP et al. 1951	2nd RESEARCH	---	---	LUNEL	---	---	---	---	---
WAT et al. 1957	1st RESEARCH	2nd RESEARCH	ACF PERFECT	LUNEL	MSK BOKSE 100-100	3 RESEARCH	NO. 100, 21 AND 100-25	---	1,000 MIA

# PRODUCCION DE ANTICUERPOS FRENTE A TESTOSTERONA

AUTOR Y AÑO	INMUNOGENO (R.M. E : CARRIER)	DET. INC. MOLAR	ADYUVANTE	ESPECIE ANIMAL	MET. INMUNIZACION	SANGRIAS	PURIFICACION	ESPECIFICIDAD (> 99% R.C.)	TITULO
WEINSTEIN et al., 1972	7 $\alpha$ CTB:BSA 7 $\alpha$ T 7TB:BSA (10:1) 7 $\alpha$ A 7TB:BSA (10:1)	ESPECTRO U.V.	ACF	CONEXO F	1 mg/MSSC	3 <sup>a</sup> SEMANA	—	5 $\alpha$ DHT: 42 - 35	7 $\alpha$ T-TE: 1/4.000- 1/10.000 7 $\alpha$ T-TE: 1/3.000
ROSCHE et al., 1974	11 $\alpha$ OH T11HS:BSA (1:1) T 3CMO:BSA (14:1) T 17HS:BSA (9:1)	ESPECTRO U.V. TNBS	ACF	CONEXO	3 mg SC/14 DIAS BOOST: 0.25 mg IV	1 SEMANA DESPUES 1 <sup>er</sup> BOOSTER	—	T 11HS: 5 $\alpha$ DHT: 27-69 T 3CMO: 5 $\alpha$ DHT: 27-33 17 $\alpha$ H ANDROSTAN- 3ONE: 23-11 T 17HS: 5 $\alpha$ DHT: 15.7-37 EPITESTOS: 34-42 ANDROSTENOD: 38-42 P4: 25,4-68	—
FOREST et al., 1976	17 $\alpha$ H P4CMO:BSA (1:1) T 3CMO:BSA (9:1)	ESPECTRO U.V. RIA	ACF	CONEXO F NZW	4 x 1 mg/10 DIAS 3 x 1 mg/SEMANA 2 x 1 mg/15 DIAS BOOSTER: 1 x MES	—	—	T 3CMO: ANDROSTENODIOL: 13/43 5 $\alpha$ DHT: 71.5	17 $\alpha$ H P4CMO: 1 AÑO 1/250.000-1/530.000 T 3CMO: 1 AÑO 1/120.000-1/450.000
RAJKOWSKI et al., 1977	T 3CMO:BSA	—	—	CONEXO	—	—	DIALISIS CELULOSA DE-32	TODOS + 10%	1/500
TATESHII et al., 1977	T 3CMO:BSA	—	—	CONEXO	—	—	—	5 $\alpha$ DHT: 53	—
WICKINGS et al., 1977	—	ESPECTRO U.V. RIA	—	CONEXO NZW $\phi$ , $\phi$ , $\phi$ CASTRADOS	100 $\mu$ g/IDMS	3 SEMANAS	—	5 $\alpha$ DHT: 25-100	$\phi$ : 1/240.000 $\phi$ : 1/105.000-1/200.000



[illegible]

## II.- FISIOLOGIA DEL CICLO ESTRAL BOVINO

La fisiología del ciclo estral bovino es complicada y el conocimiento de los fenómenos que acontecen a lo largo del mismo, ha constituido un problema que ha interesado desde hace mucho tiempo a una gran número de investigadores.

Los primeros estudios, sobre el ciclo estral en esta especie, se basaron en observaciones externas del aparato genital de las hembras, con el fin de determinar la longitud del mismo y la funcionalidad ovárica: estudios morfológicos en ovarios obtenidos en el matadero (peso, medidas ováricas, número, aspecto y localización de cuerpos lúteos); estudios mediante palpación rectal (detección de cuerpos lúteos de ciclo y gestación), estudio del número de gestaciones ocurridas en uno u otro cuerno uterino, incidencia de folículos antrales de gran tamaño en el ovario derecho e izquierdo; estudios histológicos de los cambios en el endometrio producidos a lo largo del ciclo, etc. (Hammond, 1927, 1955; Clark, 1936; Reece y Turner, 1938; Asdell et al., 1949; Hanckock, 1951; Rajakoski, 1960). Estos estudios se han realizado en hembras de muy distintas edades y se llegó a la conclusión de que el ovario derecho poseía una funcionalidad superior a la del izquierdo, por cuanto que el número de ovulaciones, cuerpos lúteos y gestaciones era muy superior en este lado.

Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos que controlan el ciclo estral de la vaca, ha experimentado un extraordinario avance a partir de la década de los cincuenta con el desarrollo de los distintos métodos de diagnóstico: radiográficos, ecográficos, ultrasonográficos y sobre todo hormonales. Con la aparición y evolución de las nuevas técnicas de diagnóstico hormonal (RIA, EIA, etc.) ha sido posible determinar las concentraciones de las hormonas hipofisarias, ováricas y adrenales, en sangre, tejidos, orina, leche y líquido folicular.

El estudio hormonal se completó posteriormente con estudios morfológicos "in vitro", de distintas estructuras del ovario: técnicas histológicas, técnicas de separación celular, estudio de receptores hormonales en tejidos ováricos, métodos ultraestructurales para la determinación de las funciones de los orgánulos celulares relacionados con la secreción de hormonas en los tipos celulares específicos, estudios morfológicos de los cambios que sufre el ovario durante el proceso de atresia, etc. (Choudary et al., 1968; Marion et al., 1968; Moor et al., 1978; Byskov, 1979; Merz et al., 1981; Centola, 1983; Guraya, 1985; Lipner, 1988).

En cuanto a las características generales del ciclo estral de esta especie, podemos señalar las siguientes (Peters, 1985; Dobson y Kamonpatana, 1986; Peters y Ball, 1987):

La longitud del ciclo estral es aproximadamente de  $21,28 \pm 0,06$  días en vacas y de 23-20 días en novillas; aunque pueden existir variaciones dependiendo de la raza, aptitud, factores ambientales, etc. (Asdell et al., 1949; Rajakoski, 1960; Garverick et al., 1971). El día del estro se denomina Día 0; la duración del estro es variable situándose entre 10 y 30 horas. La ovulación tiene lugar espontáneamente aproximadamente 10 horas después del final del estro (Adeyemo et al., 1979). Existen una serie de factores externos, y ambientales o del entorno, que ejercen una influencia sobre el ciclo estral de esta especie como, por ejemplo: la estación del año, las horas de luz, la temperatura y la nutrición. Los estudios que se han realizado, no son demasiado claros y determinantes en cuanto a la extensión de la influencia de los factores ambientales, aunque se sabe que se produce una disminución en la fertilidad (Chesworth y Easdon, 1983; Folman et al., 1983). La dieta en cambio, sí posee un pronunciado efecto sobre los ciclos estrales de esta especie; se sabe, que hembras a las que se les administra una dieta de "alta energía", con un alto contenido en proteína son menos fértiles y sus concentraciones de progesterona son más bajas a lo largo de todo el ciclo estral (Folman et al., 1983). Maurasse et al. (1985) determinaron que las dietas de "alta energía" ejercen un efecto negativo sobre la población folicular del ovario, favoreciendo el crecimiento de los folículos de pequeño tamaño, inhibiendo el desarrollo de los

foliculos grandes, e incrementando los procesos de atresia folicular.

Dentro de este capítulo general, vamos a referirnos a la pubertad: Sorensen et al., (1959) señalan que su aparición está relacionada con el peso corporal (250-300 Kg), por lo que es muy variable la edad a la que las diferentes razas de vacas presentan el primer estro, situándose entre los seis y doce meses. Generalmente, una vez que este primer estro ha hecho su aparición, los ciclos se suceden con regularidad.

La endocrinología del período prepuberal así como la de este período, no ha sido estudiada muy extensamente. Desjardins y Hafs (1968) estudiaron los niveles de gonadotropinas hipofisarias en terneras de 0 a 12 meses de edad; Karg et al. (1972), señalan que los folículos antrales presentes en los ovarios de las hembras prepúberes son capaces de producir cantidades considerables de estrógenos, mientras que la progesterona es de origen adrenal. Swanson et al. (1972), determinaron las concentraciones de LH y Prolactina; González-Padilla et al. (1975), realizaron una serie de trabajos en los que interrelacionaron las concentraciones de hormonas hipotalámicas, hormonas hipofisarias y ováricas, en hembras prepúberes y en el desencadenamiento de la pubertad, encontrando que no existen cambios significativos en las concentraciones de GnRH y FSH, en el período prepuberal. Las concentraciones de LH sufren fluctuaciones a lo largo de este período. Las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  en el período prepuberal son significativamente más altas (día -64 antes del primer estro) que en los días que preceden a el primer estro. La progesterona, sin embargo, se sitúa en niveles basales en el período prepuberal, para sufrir una elevación antes de la primera oleada ovulatoria de LH, adjudicando a esta hormona el papel regulador de la liberación pulsátil característica de la LH, en los ciclos estrales bovinos. Schams et al. (1981) completaron los estudios anteriores determinando las mismas hormonas y testosterona, en hembras y machos, estableciendo dos períodos en los que las gonadotropinas sufren un incremento, el segundo de los cuales coincide con la pubertad y concluyendo que el inicio de la pubertad está controlado por el mismo mecanismo neuroendocrino en ambos sexos. Bierley et al. (1987) determinaron las

concentraciones de progesterona en hembras de aptitud cárnica cruzadas en el primer y tercer ciclo estral, encontrando que estas concentraciones son superiores en el primer ciclo. Finalmente, Dodson et al. (1988) han caracterizado los patrones de la secreción de LH y FSH desde el nacimiento a la pubertad, con unos resultados similares a los ya comentados.

Continuando con la fisiología del ciclo estral, a lo largo del mismo, tienen lugar en el ovario los procesos que comprenden la foliculogénesis; es decir, el crecimiento y diferenciación foliculares, maduración y selección del folículo ovulatorio, ovulación y la atresia folicular.

La foliculogénesis está íntimamente ligada a la endocrinología del ciclo estral, puesto que la interacción de las hormonas que intervienen en este ciclo, junto con otros factores intra y extraováricos, van a regular los procesos de biosíntesis esteroide y el crecimiento y la diferenciación celular de los folículos antrales presentes en el ovario.

El ciclo estral puede dividirse en dos grandes fases, relacionadas con los acontecimientos que tienen lugar en el ovario y con la endocrinología del mismo (Choudary et al., 1968; Garverick et al., 1971; Peters, 1985): Fase folicular: días 18-1 y Fase lútea: días 2-17, aunque algunos autores señalan que en esta última se pueden distinguir, a su vez, otras tres: fase lútea temprana; días 1-4, fase lútea propiamente dicha; días 5-10 y fase lútea tardía; días 11-17, en la que tiene lugar la luteólisis (Ireland et al., 1979, 1980).

Hansel y Convey (1983) realizan otra división del ciclo estral, con el fin de interaccionar, con mayor claridad, los cambios en la secreción hormonal con el crecimiento folicular:

- 1.- Período pre-oleada: desde la regresión lútea hasta la oleada de gonadotropinas.

- 2.- Período post-oleada: desde la oleada de gonadotropinas hasta el establecimiento de la función luteínica.
- 3.- Período luteínico: durante el período de vida del cuerpo lúteo.

Como se puede comprobar, para una buena comprensión de la fisiología del ciclo estral de esta especie, las investigaciones se han dirigido hacia tres grandes campos: endocrinología del ciclo estral, foliculogénesis y atresia folicular. Con un perfecto conocimiento de los mismos es posible llegar a comprender la compleja fisiología de este ciclo, de tal manera que sea factible aprovechar en su totalidad la capacidad reproductiva de esta especie.

## 1.- ENDOCRINOLOGIA DEL CICLO ESTRAL BOVINO.

Los patrones de las hormonas implicadas en el ciclo estral bovino han sido estudiados durante las tres últimas décadas por un gran número de autores y se han dirigido fundamentalmente hacia dos vertientes:

- 1.- Hormonas hipotalámicas y hormonas hipofisarias.
- 2.- Hormonas esteroides ováricas.

La interacción que todas estas sustancias poseen entre sí determinará la regulación de este ciclo (Garverick et al., 1971; Wetteman et al., 1972; Schama et al., 1977; Dobson, 1978; Hansel y Convey, 1983; Schallenberger et al., 1984; Walters y Schallenberger, 1984; Walters et al., 1984; Peters, 1985; Dieleman et al., 1986; Abeyawardene y Pope, 1987).

Un capítulo aparte, merece la consideración de las prostaglandinas como un factor fundamental en el mecanismo regulador de la endocrinología del ciclo estral.

1.- La hormona hipotalámica que está implicada en la liberación de las gonadotropinas hipofisarias es la GnRH o LHRH (Gonadotrophin releasing hormone, hormona liberadora de gonadotropinas). El patrón de la secreción de esta hormona no está aún bien establecido en esta especie, debido a la inexistencia de una técnica específica y sensible para ello. Se sabe que su liberación se realiza en forma de pulsos, coincidiendo cada uno de ellos con la secreción de LH (Hansel y Convey, 1983; Peters, 1985).

Las principales gonadotropinas hipofisarias del ciclo estral bovino son LH (luteinizing hormone, hormona luteinizante) y FSH (follicle stimulating hormone, hormona estimulante de los folículos). La influencia que la prolactina ejerce en el ciclo aún no está bien constatada; Hsueh et al. (1984), la señalan como un factor regulador de la foliculogénesis, que actuaría a nivel de las células de la granulosa.

La FSH puede ser considerada como la hormona iniciadora del crecimiento folicular, estimulando también el establecimiento de receptores de LH en las células foliculares (Hansel y Convey, 1983). Esta hormona presenta un pico, u oleada, plasmático que coincide con el pico, u oleada, preovulatorio de LH en el momento del estro (Schams y Schallenberger, 1976; Dobson, 1978). Aproximadamente 24 horas más tarde, presenta un segundo pico, aunque de menor magnitud (Dobson, 1978; Webb et al., 1980). Schams et al. (1977) señalan la existencia de picos adicionales, que tienen lugar a lo largo de todo el ciclo estral y que están relacionados con las oleadas de desarrollo folicular. Schallenberger et al. (1984) y Walters y Schallenberger (1984) señalan que la FSH posee una secreción pulsátil, aproximadamente cada hora, a lo largo de todo el ciclo estral.

La LH es la hormona estimuladora de la maduración y rotura del folículo de Graaf y de la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Las concentraciones medias de LH, durante la fase lútea del ciclo estral son relativamente bajas. Como ya hemos señalado, esta hormona, junto con la anterior, presenta un gran pico coincidiendo con el desencadenamiento del estro, la ovulación se produce aproximadamente entre las 24 y las 30 horas después de este pico (Schams et al.,

1977; Dobson, 1978; Hansel y Convey, 1983; Walters y Schallenberger, 1984).

A lo largo del ciclo estral, la secreción de LH es pulsátil o episódica. Rahe et al. (1980) dividen esta secreción de LH en tres categorías que reflejan el estadio del ciclo:

- a) En la fase lútea: se produce una secreción pulsátil de elevada amplitud y baja frecuencia (un pulso/4 horas).
- b) Durante la luteolisis y la fase folicular: pulsos con mayor amplitud y frecuencia incrementada, culminando con el pico preovulatorio de LH.
- c) Período post-pico preovulatorio: pulsos de baja amplitud y alta frecuencia (uno/hora). Esta secreción está directamente relacionada con los cambios que se producen en las concentraciones de progesterona a lo largo del ciclo estral.

2.- Las hormonas esteroides ováricas más importantes del ciclo estral de la vaca, son el estradiol-17 $\beta$  y la progesterona (Stabenfeldt, 1969; Hansel y Echternkamp, 1972; Schams et al., 1977).

Las concentraciones plasmáticas de estradiol-17 $\beta$  presentan un pico muy elevado antes del estro y un segundo pico alrededor de los días 5-6 del ciclo, permaneciendo en niveles basales durante la fase lútea de éste (días -12 a -2), para ir aumentando desde el desencadenamiento de la luteolisis, alcanzando una meseta aproximadamente 26 horas antes del desencadenamiento del estro (Hansel y Convey, 1983; Peters, 1985; Dieleman et al., 1986). Este incremento en las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  está correlacionado con el crecimiento del folículo ovulatorio que se produce en la fase preovulatoria del ciclo (Dieleman et al., 1983). Ireland et al. (1984) han determinado las concentraciones producidas por cada ovario a lo largo del ciclo estral, concluyendo que uno de los dos ovarios es el



responsable del incremento en las concentraciones plasmáticas de esta hormona. Se ha postulado que el incremento de las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  estimula los picos preovulatorios de las gonadotropinas mediante un sistema de retrofuncionalidad positiva, incrementando la sensibilidad de las gonadotropinas a la GnRH y estimulando al mismo tiempo la liberación de esta hormona (Kesner et al., 1981). Todavía no se conoce exactamente el significado funcional del segundo pico de estradiol-17 $\beta$  que se produce alrededor del día 6 del ciclo, aunque se ha asociado con una de las oleadas de crecimiento folicular (Schallenberger et al., 1986; Ireland, 1987).

La progesterona es secretada en grandes cantidades por el cuerpo lúteo. Las concentraciones plasmáticas de esta hormona reflejan el desarrollo, mantenimiento y regresión de este cuerpo lúteo. Las concentraciones comienzan a elevarse desde el día 4 del ciclo hasta alcanzar un pico entre los días 8 y 16, posteriormente descienden hasta valores basales antes del estro y la ovulación (Garverick et al., 1971; Wetteman et al., 1972; Schams et al., 1977). Esta hormona ejerce un efecto de retrofuncionalidad negativa sobre la liberación de LH (Roche y Ireland, 1981; Ireland y Roche, 1982; Hansel y Convey, 1983) reduciendo la frecuencia de los pulsos de LH, influyendo en la terminación del pico preovulatorio de estradiol-17 $\beta$  (Aberyardene y Pope, 1987). La progesterona presenta también un patrón pulsátil de secreción, coincidiendo en la fase lútea con los pulsos de FSH (Walters et al., 1984).

La función de los andrógenos en la endocrinología del ciclo estral bovino aún no es muy clara. Wise et al. (1982) señalan que las concentraciones de androstenediona, dehidroepiandrostenodiona y testosterona se incrementan alrededor del desencadenamiento del estro. Se sabe que estos andrógenos son intermediarios del estradiol-17 $\beta$ , en la esteroidogénesis que tiene lugar en los folículos antrales ováricos. Sin embargo, es posible que posean alguna influencia en la inducción del comportamiento de las hembras en el estro (Peters, 1985).

Las prostaglandinas poseen una importante función en la regulación del

ciclo estral bovino, sobre todo la PGF2 $\alpha$ , que se produce en el útero. Se ha postulado un mecanismo de contracorriente desde la vena uterina a la arteria ovárica ipsilateral, mediante el cual se produciría la transferencia de la PGF2 $\alpha$  desde el útero al ovario. Esta liberación de PGF2 $\alpha$  desde el endometrio parece depender de un período de exposición al estradiol-17 $\beta$  y a la progesterona durante la fase lútea del ciclo estral. El mecanismo mediante el cual la PGF2 $\alpha$  ejerce su efecto luteolítico ha sido objeto de una gran controversia entre los autores, aunque parece estar relacionado con la interferencia específica que esta sustancia causa sobre la unión de la LH y de la adenil-ciclase a nivel de la membrana celular de las células lúteas.

Schallenberger et al. (1984); Walters y Schallenberger (1984) y Walters et al. (1984), después de una serie de estudios exhaustivos sobre los cambios endocrinos que acontecen a lo largo del ciclo estral, han sugerido un modelo para explicar el control endocrino de este ciclo:

- La FSH se secreta con una frecuencia mayor que la LH durante la fase lútea, y además, la modulación de la LH parece ser más sensible al fenómeno de retrofuncionalidad, producido por los esteroides.

- Los pulsos de progesterona ocurren como resultado directo de los pulsos de FSH y los pulsos de estradiol-17 $\beta$  se producen como consecuencia del estímulo de LH.

- Después de la liberación de PGF2 $\alpha$ , la caída de las concentraciones de progesterona se reduce y se elimina el efecto de la retrofuncionalidad negativa sobre la secreción de gonadotropina, de tal modo que se alcanza un incremento en la frecuencia de LH y con una menor extensión, sobre los pulsos de FSH.

- El incremento en la frecuencia de los pulsos de LH y FSH estimula el desarrollo del folículo grande preovulatorio que secreta cantidades crecientes de estradiol-17 $\beta$ .

- Los pulsos de alta frecuencia y amplitud del estradiol-17 $\beta$ , provocados en gran manera por la LH, estimulan eventualmente la oleada preovulatoria de gonadotropina que al final es la causante de la ovulación.

- El incremento secundario en las concentraciones plasmáticas de FSH, después de la oleada preovulatoria, parece ser el resultado del incremento en amplitud de los pulsos de FSH. No se conoce en profundidad el mecanismo final por el cual ésto ocurre, pero podría estar relacionado con la eliminación de los efectos negativos de la retrofuncionalidad producida por las hormonas foliculares, como por ejemplo el estradiol-17 $\beta$ .

## 2. FOLICULOGENESIS OVARICA.

Agrupados bajo el término foliculogénesis se encuentran los procesos implicados en el desarrollo y crecimiento de los folículos antrales del ovario y la selección del folículo o folículos ovulatorios.

Greenwald (1972) afirma que "Uno de los misterios más intrincados de la fisiología ovárica es el conocimiento de los factores que determinan que un folículo permanezca inactivo, otro comience su desarrollo pero más tarde se vuelva atrésico mientras que un tercero madura y ovula".

En el transcurso de la foliculogénesis se suceden procesos espectaculares como por ejemplo: el incremento en diámetro que un folículo primordial del ovario puede alcanzar antes de la ovulación, estimado en unas 400-600 veces; el crecimiento de 500 a 1000 folículos primordiales durante cada ciclo estral que da como resultado el desarrollo de un folículo ovulatorio y, sobre todo, el hecho de que durante la vida de una hembra, el 99,9% de los folículos primordiales no vayan a ovular.

Todo ello reafirma la opinión de Greenwald (1972) e ilustra que, no sólo el desarrollo de un folículo ovulatorio es un fenómeno biológico extremadamente raro, sino que también la foliculogénesis es compleja (Ireland, 1987).

Se han intentado resolver las interrogantes planteadas para la comprensión de la foliculogénesis de las distintas especies. Lacker et al. (1987 a, b) y Meuli et al. (1987), mediante un modelo matemático, intentaron explicar la fisiología de los mecanismos que regulan el desarrollo folicular y el número de ovulaciones. Modelo matemático que han pretendido validar mediante resultados experimentales; estos autores proponen que las interacciones foliculares están mediadas por el estradiol-17 $\beta$  que actúa como mensajero químico, y es utilizado por los folículos en los procesos de selección para comunicar su maduración al eje hipotálamo-hipófisis y a los restantes folículos. Sin embargo, ésto no parece ser tan sencillo y aún

permanecen bastantes puntos oscuros, que son vitales para obtener el máximo rendimiento reproductivo en las hembras de cualquier especie.

Roche y Boland (1991) afirman que el perfecto conocimiento de la foliculogénesis es de vital importancia para el desarrollo de programas comerciales de transferencia de embriones, tan en boga en los últimos años. Estos autores definen la foliculogénesis como una serie de procesos recurrentes de desarrollo folicular y ovulación, regulados por una combinación coordinada de intrincadas interacciones entre hormonas, factores de crecimiento, sistemas de comunicación célula a célula y productos de los genes.

Los folículos son las principales unidades funcionales del ovario (Centola, 1983). La función de cada uno de ellos es la de proveer el sistema de soporte (requerimientos nutritivos, estímulo inicial de crecimiento, control de la maduración nuclear y citoplásmica, etc.), necesario para que el oocito, o célula germinal femenina, alcance su potencial máximo, de tal manera que al unirse con un espermatozoide, o célula germinal masculina, se produzca un embrión capaz de desarrollarse dando lugar a un nuevo individuo (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Los tipos de folículos que forman la población folicular de los ovarios, han sido descritos mediante distintas clasificaciones que distinguen los folículos en términos de tamaño, morfología del oocito y número y organización de las células granulosas que sirven de soporte a ese oocito; o en relación con la esteroidogénesis que tiene lugar en cada uno de ellos (Centola, 1983; Greenwald y Terranova, 1988; Gore-Langton y Armstrong, 1988).

En la vaca, la ovogénesis se completa al nacimiento, la culminación del desarrollo fetal son los folículos primordiales, localizados en la corteza del ovario, generalmente en grupos y formados por el oocito, rodeado de una capa de células. Integran éstos el grupo de los folículos sin crecimiento, del que surgirán luego el resto de los tipos foliculares. Los folículos preantrales o en crecimiento están formados por el oocito rodeado de la zona pelúcida y de varias capas de células:

membrana granulosa y teca. Los folículos antrales o de Graaf están caracterizados por la aparición de un antro o cavidad que se llena de un líquido, sintetizado por las células de la granulosa inicialmente, recibiendo en estadios posteriores sustancias sintetizadas por las células de la teca. El oocito se encuentra rodeado por la zona pelúcida y un "monte" de células granulosas denominado el cúmulo de oóforos. La capa granulosa está formada por varios estratos y crece a medida que lo hace el folículo, las tecas interna y externa son las capas más superficiales de este tipo folicular (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Estos folículos poseen una fisiología muy específica, relacionada con la composición del líquido folicular que se produce en el antro.

Los estudios que se han realizado sobre la composición y propiedades del líquido folicular de la vaca, son escasos pero muy exhaustivos. Edwards (1974) analizó la composición del líquido folicular (iones, glúcidos, mucopolisacáridos y lípidos, proteínas, gonadotropinas y esteroides) comprobando que está compuesto en parte por la secreción de las células del folículo y en parte por exudados del plasma. Esta composición es un reflejo de la fisiología de los folículos antrales y de los cambios de secreción que se producen en las células de la teca interna y de la granulosa.

Peters y McNatty (1980) completaron el estudio anterior haciendo más hincapié en la composición proteica de este líquido folicular, señalando la existencia, en el líquido folicular de la vaca, de una proteína que une o liga andrógenos (ABP, androgen binding protein), similar a la proteína transportadora de testosterona del plasma. Esta proteína se encuentra en grandes cantidades en el líquido folicular de los folículos quísticos. No hay evidencias que prueben la existencia de proteínas similares para progesterona o estradiol-17 $\beta$ . Señalan también que los distintos componentes de este líquido folicular sufren cambios constantes y que existen sustancias o factores que inhiben la maduración del oocito.

Wise (1987), realizó también un análisis exhaustivo del líquido folicular bovino, análisis bioquímico, proteínas totales, enzimas lisosomales, iones, contenido

en ácido ascórbico y concentraciones de esteroides, pero relacionando todos ellos con el tamaño folicular, la situación del ovario, día del ciclo estral y clasificación de atresia. Este complejo estudio intentó conseguir dos objetivos primordiales. En primer lugar, aclarar las interacciones bioquímicas de los constituyentes del líquido folicular con el oocito y las células de soporte que le rodean. El segundo objetivo fue la comprensión de los cambios endocrinos básicos, que acompañan la maduración folicular. Este autor estudió las posibles correlaciones existentes entre los niveles de hormonas plasmáticas y foliculares, aunque no llega a resultados muy claros. Señala una clasificación endocrina de la atresia folicular basada en la relación andrógenos/estradiol-17 $\beta$  o progesterona/estradiol-17 $\beta$ .

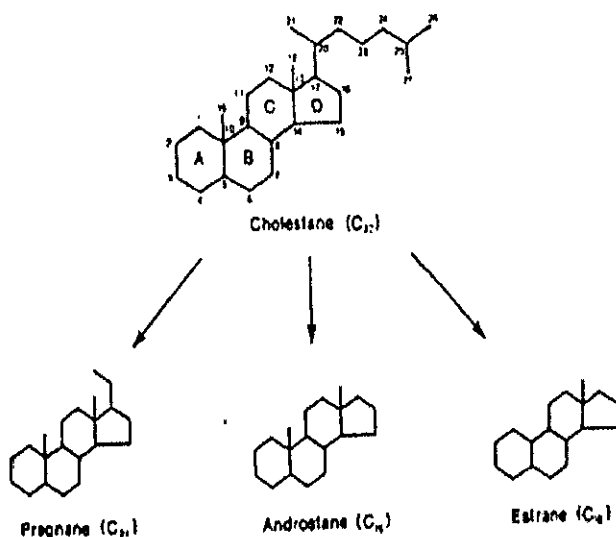
Las hormonas esteroides son las sustancias más conocidas y mejor caracterizadas de todos los componentes del líquido folicular. Estas sustancias poseen tres tipos de funciones relacionadas con la fisiología del folículo antral: endocrina, paracrina y autocrina; los esteroides secretados por las células de la granulosa, no sólo influyen sobre la producción de las células tecaes y sobre la maduración del oocito, sino que actúan también sobre el índice mitótico y la diferenciación de las propias células de la granulosa.

Existen dos tipos de clasificaciones de estas hormonas: química o estructural y funcional.

Todas ellas derivan de un núcleo químico común formado por tres anillos esteroideos (A, B y C) y un ciclopentano (D). El precursor de los tres tipos de hormonas esteroides es el Colestano (C-27) (precursor del colesterol). En su estructura posee grupos metilo en la unión de los anillos A y B (C-10) y en la unión de los anillos C y D (C-13) y una cadena lateral de ocho carbonos unida al C-17.

La ruptura de la cadena lateral entre C-20 y C-22, conduce a la formación de los esteroides C-21, o serie pregnano, a la cual pertenecen los progestágenos. Una nueva ruptura de la cadena lateral entre C-17 y C-20 produce los esteroides C-19, o serie androstano, a la cual pertenecen los andrógenos. Por último, la eliminación del grupo metilo del C-10 conduce a la formación de los esteroides C-18, o serie estrano, a la que pertenecen los estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

(Dibujo 2. Clasificación química de las hormonas esteroides foliculares)



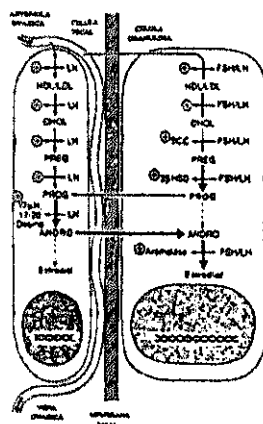


Las hormonas esteroides foliculares también denominadas esteroides sexuales pertenecen a tres clases funcionales: estrógenos, progestágenos y andrógenos (Peters y McNatty, 1980). Estos autores consideran el ovario como un agregado de tres tejidos endocrinos: el estroma, el folículo y el cuerpo lúteo, todos ellos con capacidad de síntesis y secreción de hormonas esteroides.

Los estrógenos más importantes sintetizados por el ovario son el estradiol-17 $\beta$  y la estrona. La progesterona es el progestágeno más activo, seguida de la 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona y de las 20 $\alpha$  y 20 $\beta$ -dihidro-progesterona. Los andrógenos más importantes son la testosterona y la androstenediona.

La biosíntesis de las hormonas esteroides es un proceso complejo de tal forma que distintas vías de biosíntesis pueden conducir a los mismos productos. En la vaca, se ha propuesto un patrón de esteroidogénesis en el cual se encuentran implicados los dos tipos principales de células del folículo antral, las células de la teca interna y las células de la granulosa (Hansel y Fortune, 1978; Peters y McNatty, 1980; Hansel y Convey, 1983; Peters, 1985; Ireland et al., 1987).

(Dibujo 3. Esteroidogénesis folicular en la vaca, Ireland 1987).



El dibujo 3 (Ireland, 1987), es una representación esquemática de la esteroidogénesis folicular. A primera vista, este esquema puede resultar complicado, sin embargo, es ideal para explicar el patrón de la esteroidogénesis ovárica y su regulación por parte de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH.

El colesterol (CHOL), almacenado en las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL/LDL), es el precursor de la esteroidogénesis folicular en ambos tipos celulares. En las células de la teca interna y bajo el estímulo de la LH, que actúa en la activación del sistema enzimático mitocondrial (SCC), encargado de la ruptura de la cadena lateral, pasa a pregnenolona (PREG) y posteriormente a progesterona (PROG), y vía delta 4, a 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona y de ahí a androstendiona y testosterona, o bien vía delta 5, pasa de pregnenolona a 17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona, dehidroepiandrosterona, androstendiona y testosterona. En estas vías de síntesis están implicados los sistemas enzimáticos de las 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona y 17-20-desmolosas, que rompen la cadena lateral dando lugar a los andrógenos (Erickson et al., 1985). Estos sistemas enzimáticos también están activados por la acción de la LH.

La diferenciación de las células de la teca interna, en productoras de andrógenos, es imprescindible para que las células de la granulosa comiencen a sintetizar estradiol-17 $\beta$  (McNatty et al., 1984).

Siguiendo el esquema del dibujo 3, se puede observar que en las células de la granulosa, la biosíntesis esteroide es ligeramente distinta. En este tipo celular, la acción sinérgica de las dos gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) (Hsueh, 1984) activa todos los pasos de la biosíntesis esteroide, comenzando por la ruptura de las lipoproteínas de alta y baja densidad, que liberan el colesterol; mediante la activación del sistema enzimático mitocondrial (SCC), se rompe la cadena lateral y se produce pregnenolona que, mediante la acción de la enzima 3 $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD), pasa a progesterona. Los andrógenos producidos en las células de la teca interna pasan al interior de la célula granulosa y en ella mediante la activación del sistema enzimático de la aromatasa (modulado

también por las gonadotropinas hipofisarias, aunque el papel de la FSH en este último paso es primordial) se sintetiza estradiol-17 $\beta$ . La activación del sistema de la aromatasas, es un punto clave para la foliculogénesis en la vaca, puesto que la síntesis de estradiol-17 $\beta$  va a constituir el inicio del proceso de la dominancia, al que posteriormente nos referiremos.

Las investigaciones sobre la foliculogénesis se han dirigido hacia tres vertientes, aunque existen muchos autores que en el mismo estudio las incluyen todas: estudio de los cambios morfológicos que se producen durante el desarrollo de los folículos ovulatorios, estudio de los cambios endocrinos y estudio del control del crecimiento y desarrollo folicular.

Goodman y Hodgen (1983), han recogido los términos más utilizados por los distintos autores para la descripción de la foliculogénesis:

**Recrudescimiento:** proceso gonadotropina-dependiente durante el cual un grupo de folículos adquieren la habilidad para responder a las gonadotropinas y las necesitan para su crecimiento continuado.

**Selección:** proceso por el cual sólo unos pocos folículos "recrudescidos" son seleccionados, escapando a la atresia y en los que se produce la ovulación.

**Dominancia:** mecanismo utilizado por el (o los) folículos ovulatorios (dominantes) para escapar de la atresia. Este fenómeno es imprescindible para la comprensión de la foliculogénesis, puesto que sugiere que algunos folículos sobreviven en un medio supresivo del crecimiento de otros, o que algunos folículos previenen el crecimiento de otros (Ireland, 1987; Ireland et al., 1987).

Todavía se conoce relativamente poco acerca del patrón de crecimiento o dinámica folicular de la vaca. Fortune y Hansel (1988) señalan que cuatro han sido los métodos generales empleados para su estudio:

- a) Contaje de los folículos presentes en los ovarios obtenidos en el matadero.
- b) Contaje de los folículos obtenidos en el matadero, acompañado de la determinación de hormonas esteroides en el líquido folicular.
- c) Seguimiento de folículos individuales dentro del animal, mediante marcaje con tinción.
- d) Observaciones del nuevo crecimiento de folículos grandes después de la destrucción de los folículos grandes del ovario.

Los primeros estudios que se realizaron para el conocimiento de la foliculogénesis, y de la dinámica folicular en la vaca, se basaron en los cambios morfológicos que se producen durante el crecimiento folicular. Rajakoski (1960) realizó un estudio exhaustivo del sistema folicular ovárico de novillas sexualmente maduras, estudiando variaciones de los folículos de Graaf mayores de 1mm, a lo largo de todos los días del ciclo estral, en diferentes estaciones del año y en relación con la situación del ovario. A partir de estos estudios morfológicos llegó a la conclusión de que el número de folículos varía con la estación del año y el día del ciclo y, lo que es más importante, durante el ciclo estral de la vaca, se producen dos oleadas de crecimiento folicular: la primera entre los días 3 y 4, produciéndose un folículo grande que se volverá atrésico y la segunda entre los días 12 y 14, culminando con la ovulación.

Choudary et al. (1968) y Marion et al. (1968), difieren de los resultados de Rajakoski, después de examinar histológicamente las características morfológicas de los ovarios de 700 hembras con una historia reproductiva conocida. Estos autores concluyeron que el crecimiento folicular era continuo y que los folículos alcanzan un diámetro mayor de 10 mm independientemente de los días del ciclo. En un trabajo posterior (Marion y Gier, 1972) establecen que existe una media de 11 folículos que, en cada ciclo estral, crecen más de 8 mm de diámetro, al existir

una progresión constante de los folículos grandes.

Dufour et al. (1971) marcando con tinta y Matton et al. (1981) cauterizando los folículos mayores de 5 mm de diámetro, concluyeron que el crecimiento y reemplazo del folículo más grande del ovario es más rápido al final del ciclo y que el folículo ovulatorio, es el más grande que se encuentra en los dos ovarios, aproximadamente tres días antes del estro.

Los procesos de crecimiento folicular, en relación con la esteroidogénesis que tiene lugar en los folículos antrales de esta especie, han sido estudiados por un gran número de autores.

Ireland et al. (1979, 1980, 1982 y 1983 a, b), realizaron una serie de estudios sobre el desarrollo folicular de la vaca a lo largo del ciclo estral, para lo cual, dividieron este ciclo en cuatro fases o estadios: I (días 1-4), II (días 5-10), III (días 11-17) y IV (días 18-20), dependiendo de la apariencia macroscópica del cuerpo lúteo, clasificación que ha sido seguida por numerosos autores. En su primer trabajo, estudiaron los folículos de distintos tamaños (pequeños medianos y grandes) que forman la población de folículos antrales del ovario; su número, volumen, el peso del ovario y determinaron las concentraciones de estrógenos y progesterona del líquido folicular, en las cuatro fases del ciclo estral. Encontraron variaciones significativas de todos estos parámetros, dependiendo de la fase del ciclo, sobre todo en lo que se refiere a las concentraciones de hormonas esteroideas del líquido folicular. En los folículos pequeños, predomina la progesterona que va aumentando en las tres primeras fases del ciclo para disminuir en la fase folicular, coincidiendo con la luteolisis. Los estrógenos aumentan progresivamente con los días del ciclo. En los folículos medianos, se produce un aumento brusco de la progesterona en la segunda fase del ciclo. Los estrógenos disminuyen bruscamente en la última fase del ciclo. Por último, en los folículos grandes, las concentraciones de progesterona son elevadas a lo largo de todas las fases del ciclo estral, aunque disminuyen ligeramente en las dos últimas. Los estrógenos permanecen prácticamente inalterables a lo largo de todo el ciclo. Relacionan el tamaño

folicular con su contenido de progesterona y estrógenos (P4/E2) observando un aumento de estrógenos, relacionado con el aumento del tamaño folicular (12:1 en folículos pequeños frente a 4:1 en folículos grandes), y lo atribuyen al aumento en la capacidad de aromatización de las células de los folículos grandes. Correlacionan las concentraciones obtenidas en los distintos folículos con las concentraciones plasmáticas de progesterona, encontrando diferencias entre los folículos pequeños y medianos y los días del ciclo estral. Con los folículos grandes no encuentran correlaciones. Señalan también, que el número de folículos y el volumen de éstos aumentan progresivamente a lo largo del ciclo estral.

En trabajos posteriores (1982, 1983 a, b), relacionan el desarrollo de los folículos antrales con los cambios de hormonas esteroides del líquido folicular y las plasmáticas, y con el número de receptores de gonadotropinas presentes en las células foliculares de folículos ovulatorios, después de la luteolisis, espontánea o inducida, y en folículos no ovulatorios (días 1-13 del ciclo estral). Clasifican estos folículos en relación con su contenido en estrógenos, denominándolos estrógeno-activos o inactivos. Los primeros poseen diámetros, volúmenes y concentración de estrógenos, significativamente más elevadas que los segundos, en los que predomina la progesterona. Señalan que los folículos del primer tipo son potencialmente ovulatorios y los del segundo atresicos y que las oleadas de gonadotropinas pueden ser la señal endocrina para la diferenciación de una célula granulosa en luteínica (relación con el número de receptores). Sugieren una clasificación endocrina para diferenciar folículos atresicos de los no atresicos, relacionando el contenido de progesterona y andrógenos con el de estrógenos (E2/P4 + A) y la señalan como más rigurosa que la clasificación morfológica propuesta por otros autores, como por ejemplo, Rajakoski en 1960 y Moor et al. en 1978.

Paralelamente, otros autores realizaron estudios muy similares. Henderson et al. (1982), relacionaron el contenido de gonadotropinas y la concentración de esteroides en el líquido folicular, con el tamaño de los folículos antrales, aunque su clasificación es poco rigurosa, ya que analizan los folículos de los tres tamaños (pequeño, mediano y grande) en conjunto, por lo que sus resultados son confusos

y sólo encuentran relación con el aumento de tamaño folicular y el incremento de las concentraciones de estradiol-17 $\beta$ .

Otro grupo de autores (Grupo de Dieleman de la Universidad de Utrecht) realizó varios trabajos sobre la foliculogénesis bovina. Kruip y Dieleman (1982), clasifican macroscópicamente los folículos antrales bovinos de distintos tamaños (2-20 mm) según sus características morfológicas en: no atrésicos, ligeramente atrésicos, indeterminados, atrésicos y fuertemente atrésicos, relacionando esta clasificación morfológica con el contenido en estradiol-17 $\beta$  del líquido folicular y encontrando una elevada correlación entre ambas clasificaciones. Este criterio ha sido ampliamente seguido por otros autores en estudios posteriores. Seguidamente (Dieleman et al., 1983), determinaron los cambios en el contenido de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona de folículos preovulatorios en relación con la oleada ovulatoria de LH. El comportamiento de las tres hormonas es muy distinto. Las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  van disminuyendo poco a poco, la progesterona presenta dos picos, entre las 0-2 horas y entre las 6-20 horas después de la oleada ovulatoria de LH. Los niveles de testosterona son más elevados antes de esa oleada de LH. Con estos resultados, estos autores dividen el período que va desde la oleada de LH hasta la ovulación en cuatro fases, relacionadas con la predominancia y posterior descenso de los niveles de estradiol-17 $\beta$  en el líquido folicular de estos folículos. También investigan el posible papel de la LH en la regulación de la esteroidogénesis, al estimular directamente la producción de progesterona y testosterona, en las células de la teca interna, inhibir la producción de estradiol-17 $\beta$  en las mismas células y favorecer la luteinización de las células de la granulosa.

Posteriormente McNatty et al. (1984) y Hansen et al. (1988), realizaron estudios similares en otros días del ciclo estral corroborando el efecto regulador de la LH sobre la esteroidogénesis folicular.

Kruip y Dieleman, (1985) determinaron las concentraciones de hormonas esteroideas (estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona) en folículos de 2-20 mm y las relacionaron con el tamaño folicular, su calidad y el estadio del ciclo estral,

encontrando correlaciones significativas entre todos estos parámetros. Señalan que los folículos pequeños (2-5 mm) son ricos en andrógenos al poseer receptores de LH en la teca interna y pocos en la granulosa, con lo que la aromatización de éstos en estradiol-17 $\beta$  es escasa. Al aumentar el tamaño folicular aumentan los receptores de LH en las dos capas, y la función esteroidogénica se desplaza hacia el lado del estradiol-17 $\beta$ , siendo los folículos mayores de 11 mm ricos en esta hormona. Los folículos medianos son indeterminados. Apuntan una clasificación endocrina de folículos atrésicos y no atrésicos similar a la de Ireland et al. (1982), aunque señalan que se debe completar con una clasificación morfológica. Las variaciones existentes entre estas hormonas, en las distintas fases del ciclo estral, son muy significativas, estando relacionadas con los niveles plasmáticos de gonadotropinas por lo que se deben tener en cuenta a la hora de realizar la clasificación endocrina de la atresia folicular.

Finalmente (Dieleman y Bevers, 1987), estudiaron el desarrollo de los folículos preovulatorios, desde la luteolisis hasta la ovulación, señalando resultados muy similares a los ya apuntados, aunque realizan un estudio morfológico de la pared folicular más detallado, para determinar la actividad de la aromatasa y la luteinización de estas células.

Otros autores realizaron estudios muy similares a los anteriores, aunque introduciendo ligeras diferencias. Fortune y Hansel (1985), determinaron las concentraciones de esteroides y gonadotropinas en vacas normales y superovuladas, concluyendo que estas últimas sufrían una alteración en la esteroidogénesis folicular, que refleja las variaciones en el número de embriones normales encontrados entre estas hembras.

Braden et al. (1986) compararon el desarrollo folicular de hembras en el período post-parto con otras cíclicas, encontrando que no existen diferencias significativas entre este período y la fase lútea del ciclo estral y señalaron que la capacidad ovárica, en cuanto a función esteroidogénica se refiere, no es un factor limitante en el anestro post-parto.



Brantmeier et al. (1987), realizaron un extenso estudio sobre la influencia que el estado del ciclo, la localización del cuerpo lúteo y el número de folículos grandes, poseen sobre las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  del resto de los tamaños foliculares. Sus conclusiones son muy similares a las encontradas por los autores mencionados anteriormente. Lo interesante es la influencia de los folículos grandes, sobre los medianos, disminuyendo sus concentraciones de estradiol-17 $\beta$ , mientras que los folículos pequeños poseen algún tipo de "protección" que impide que este efecto se produzca sobre ellos.

En los últimos años, los estudios de la dinámica folicular bovina se han completado "in vivo" utilizando la ultrasonografía como método de seguimiento de los folículos en crecimiento. Las situaciones en las que se ha empleado este método de diagnóstico han sido muy variadas.

Quirk et al. (1986) monitorizaron el crecimiento, ovulación y regresión de folículos ováricos individuales mayores de 5 mm durante la fase folicular del ciclo estral, en hembras con luteolisis espontánea o inducida con PGF2 $\alpha$ , encontrando diferencias entre ellas, en cuanto al tamaño del folículo ovulatorio, pero con un comportamiento similar entre hembras con luteolisis espontánea o inducida.

Ireland y Roche (1987) propusieron una hipótesis sobre el desarrollo de los folículos dominantes, a lo largo del ciclo estral bovino, señalando que se producen varios ciclos de desarrollo de folículos dominantes durante el mismo ciclo, cada uno de ellos con tres fases: selección, dominancia y atresia/ovulación. En la fase de selección se produce un incremento en las concentraciones plasmáticas de FSH y varios folículos de 5-8 mm comienzan a desarrollarse. En la fase siguiente sólo uno de estos folículos alcanza un tamaño mayor, ejerciendo la "dominancia" sobre el resto, que se convierten en atrésicos. Aquel folículo es el responsable de la producción masiva de estradiol-17 $\beta$ , lo que se refleja a nivel plasmático con el aumento de las concentraciones de esta hormona. Apuntan la existencia de factores intraováricos que ayudan al folículo grande a ejercer esta dominancia. En la fase final, y dependiendo del día del ciclo y las concentraciones de gonadotropinas, este

foliculo ovula (la fase de dominancia coincide con la regresión del cuerpo lúteo) o se vuelve atrésico. Esta hipótesis fue desarrollada basándose en estudios endocrinológicos y ultrasonográficos y estos autores señalan tres oleadas de desarrollo folicular, la primera los días 0-6, la segunda los días 9-15 y la tercera y en la que se produce la ovulación los días 17-0. Otros autores (Savio et al., 1988), corroboran esta hipótesis.

Pierson y Ginther (1987 a, b, 1989 a, b) han realizado una serie de trabajos, basados en la ultrasonografía diaria de los ovarios de hembras de diferentes edades, estudiando la influencia de diversos factores sobre el desarrollo folicular como, por ejemplo, el día del ciclo, la localización del ovario y el efecto intraovárico del cuerpo lúteo sobre el crecimiento folicular, corroborando la hipótesis planteada por Ireland y Roche (1987). Sin embargo, estos autores señalan que existen hembras que sólo presentan dos oleadas de crecimiento folicular a lo largo de su ciclo estral. La funcionalidad ovárica, en ambos casos, es correcta y la aparición de la tercera oleada de desarrollo folicular está asociada con una fase luteínica más larga.

Otro de los grandes misterios de la folículoogénesis es el proceso de la atresia folicular. Numerosos autores lo han definido como el proceso durante el cual el foliculo pierde su integridad y el oocito y los componentes foliculares son eliminados mediante mecanismos distintos a los de la ovulación (Byskov, 1979; Centola, 1983). La gran mayoría de los estudios de la atresia folicular están relacionados con los cambios estructurales que sufren los componentes del sistema folicular, tanto el oocito como las células que integran la estructura folicular (Rajakoski, 1960; Marion et al., 1968; Moor et al., 1978; Kruip y Dieleman, 1982; Centola, 1983; Guraya, 1985).

A lo largo de la revisión hemos ido señalando las clasificaciones endocrinas que los distintos autores realizan de esta atresia folicular, dependiendo del contenido de hormonas esteroides del líquido folicular y de algunos otros factores, como por ejemplo el tamaño del foliculo.

Bellin y Ax (1984) y Bushmeyer et al. (1985) señalan que la elevación de los glicosaminoglicanos (polisacáridos), en particular del condroitín sulfato, puede considerarse como un indicador bioquímico de la atresia folicular puesto que dicha elevación se ha observado en folículos atrésicos clasificados como tales, mediante criterios morfológicos y endocrinos, encontrándose una correlación positiva con el contenido de este polisacárido y de las hormonas esteroides en el líquido folicular de estos folículos.

Existen grandes discrepancias entre los autores en la elección de uno y otro método, sobre todo, en cuanto a los criterios de interpretación del grado de atresia. Las clasificaciones morfológicas son complejas y están dirigidas, preferentemente, hacia estudios de maduración y fertilización "in vitro", por lo que no vamos a entrar en su descripción.

En el control del crecimiento y desarrollo foliculares se encuentran implicadas multitud de sustancias, muchas de las cuales son de reciente descubrimiento y hacia las que se están orientando un gran número de investigaciones.

Se han postulado tres tipos de procesos que regulan el desarrollo folicular: endocrinos, autocrinos y paracrinos (Tsafiriri, 1988). El control endocrino de la folículoagénesis ha sido el primero que se ha estudiado, con resultados más o menos desiguales.

Armstrong et al. (1979) y Hillier et al. (1981) analizaron la regulación de la biosíntesis folicular de estrógenos, señalando a las gonadotropinas hipofisarias, LH y FSH, como principales factores fisiológicos reguladores de esta biosíntesis. Ambas hormonas actúan sinérgicamente para estimular la secreción de estrógenos, pero a niveles distintos, la LH en las células tecaes y las dos conjuntamente, en las células de la granulosa.

Ireland (1987), realiza una extensa revisión acerca de los tres aspectos señalados como fundamentales en el control del desarrollo folicular. Señala que el crecimiento del folículo dominante y la influencia que ejerce sobre el resto de los folículos, son los primeros factores reguladores del desarrollo folicular, mediante la producción de grandes cantidades de estradiol-17 $\beta$ . Las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) son necesarias para el buen desarrollo de las funciones anteriores y la ovulación. Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de las oleadas de crecimiento folicular (ovulatoria y no ovulatoria) y la síntesis de estradiol-17 $\beta$  en los folículos dominantes, a pesar de que éstos se encuentran bajo las condiciones hormonales más variadas, a lo largo del mismo ciclo estral. El mecanismo de acción de las gonadotropinas durante la foliculogénesis, se puede resumir diciendo que estas hormonas aumentan los procesos de biosíntesis de esteroides, mediante el aumento de la actividad enzimática en las células de la teca interna y de la granulosa, después de la interacción con sus receptores específicos y de la activación de procesos dependientes del AMPc.

Se ha señalado la existencia de una serie de factores inhibidores de la unión de LH y FSH a sus receptores específicos y de una proteína reguladora del líquido folicular, que actúan inhibiendo la síntesis de estradiol-17 $\beta$ , y a través de los cuales, es posible que el folículo dominante ejerza su acción, aunque todavía no está muy claro. Se ha postulado también la existencia de interacciones entre esteroides ováricos y las enzimas esteroidogénicas. Se conocen también factores reguladores de la acción de las gonadotropinas, tanto promotores como inhibidores, siendo el estradiol-17 $\beta$  como factor promotor de la FSH, el más conocido; aunque todavía no se sabe el mecanismo mediante el cual ejerce su acción, pero quizás esté relacionado con el aumento en la síntesis de proteínas tecales o granulosas que se produce bajo la acción de esta hormona, y que pueden estar implicadas en la acción de la FSH.

Ya hemos señalado anteriormente la existencia de factores intragonadales implicados en la regulación del crecimiento y desarrollo foliculares. Ireland (1987);

Tsafriri (1988) y Toneta y diZerega (1989) han realizado unas extensas revisiones sobre los mismos y todo apunta hacia el papel clave, que estos factores van a jugar en el conocimiento completo de todos los procesos implicados en la foliculogénesis ovárica.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **A) ANIMALES.**

Para la realización de nuestro estudio se utilizan hembras de ganado vacuno de distintas edades, razas, procedencias y aptitudes.

Estas hembras se clasifican en los siguientes grupos:

### **A.1 - GRUPOS CONTROL:**

Hembras procedentes de una explotación de régimen intensivo localizada en San Juan de la Encinilla (Ávila), de raza frisona, con alimentación y estado sanitario controlados.

#### **A.1.1 - PRIMER GRUPO:**

Hembras de más de cinco años de edad, sacrificadas en el matadero municipal de Ávila, a las que se les extraen sangre y los dos ovarios. Estas hembras se clasifican como VACAS CONTROLES DE PLASMA Y OVARIOS.

Número de animales = 5

#### **A.1.2 - SEGUNDO GRUPO:**

Hembras de uno a dos años de edad, sacrificadas en el matadero municipal de Ávila, de las que se extraen sangre y los dos ovarios. Se clasifican como NOVILLAS CONTROLES DE PLASMA Y OVARIOS.

Número de animales = 5

#### **A.1.3 - TERCER GRUPO:**

Hembras de cuatro meses de edad a las que se realizan extracciones de sangre para realizar las determinaciones hormonales. Se denominan TERNERAS CONTROLES.

Número de animales = 10

#### A.1.4 - CUARTO GRUPO:

Hembras de dos años de edad, en las que se realizan extracciones de sangre durante 50 días, con el fin de controlar los niveles de hormonas esteroides a lo largo de todo el ciclo estral (se analizan dos ciclos estrales completos).

Número de animales = 2.

Estos animales no se incluyen en el estudio estadístico.

#### A.2 - GRUPOS PROBLEMA:

Hembras de procedencia desconocida sacrificadas en los siguientes mataderos:

- Matadero Giresa, Colmenar Viejo (Madrid).
- Matadero Municipal de Madrid.

Las hembras procedentes del matadero Giresa se clasifican en dos grupos según la edad:

##### A.2.1. - PRIMER GRUPO:

Hembras de más de seis años de edad, de razas frisona, morucha y retinta, de las que se extraen sangre y los dos ovarios. Se denominan VACAS GIRESA.

Número de animales = 50.

##### A.2.2. - SEGUNDO GRUPO:

Hembras de uno a tres años, de raza, charolés x retinto y suizas, de las que se extraen sangre y los dos ovarios. Se clasifican como NOVILLAS GIRESA.

Número de animales = 25.

Con las hembras procedentes del matadero municipal de Madrid se realiza la misma clasificación según su edad:



### **A.2.3. - TERCER GRUPO:**

Hembras de uno a tres años de edad, mestizas por cruce de charolés y soira, de las que se extraen sangre y los dos ovarios. Se clasifican como NOVILLAS MATADERO MUNICIPAL.

Número de animales = 25

### **A.2.4. - CUARTO GRUPO:**

Hembras de 4 meses, de raza frisona, de las que se extraen sangre y los dos ovarios. Se clasifican como TERNERAS MATADERO MUNICIPAL.

Número de animales = 10

## **B) RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.**

### **1º.- RECOGIDA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE DE LOS GRUPOS CONTROL Nº 3 Y 4:**

#### **MATERIAL:**

- Tubos vacutainer con citrato sódico de 16 x 100 mm. Becton Dickinson.
- Agujas especiales para los tubos vacutainer de 0,9 x 40 mm (20 G x 1<sup>1/2</sup>): Becton Dickinson.

La sangre se obtiene por punción de la vena yugular mediante agujas y tubos vacutainer. De cada hembra se extraen 20 ml (repartidos en dos tubos), que se conservan a 4°C hasta su posterior centrifugación.

## **2º.- RECOGIDA DE LAS MUESTRAS EN EL MATADERO:**

La recogida de las muestras en el matadero se realiza siguiendo la misma metodología para los grupos control y problema.

. **Recogida de sangre:** la sangre se obtiene, en la nave de matanza, después de la sección de la vena yugular. Para ello, se utilizan frascos de cristal, de 50 ml de capacidad a los que se les añaden 1,25 ml de una solución de citrato trisódico ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) al 50%, con el fin de obtener una concentración de 5 mg de citrato sódico/ml de sangre.

La sangre se conserva a 4°C, etiquetada convenientemente hasta su posterior centrifugación en el laboratorio.

. **Recogida de los ovarios:** se recogen los dos ovarios de las hembras a las que se les extraen muestras de sangre, en la nave de matanza y se clasifican según su situación en el animal, es decir, ovario derecho e izquierdo. Una vez obtenidos y clasificados se introducen en bolsas de plástico con una identificación del número de la hembra. Estas bolsas se colocan en un termo con hielo picado con el fin de conseguir una perfecta conservación de los órganos (entre 2 y 4°C), desde el momento de la recogida hasta su manipulación en el laboratorio.

El tiempo que transcurre entre la recogida y el procesado de las muestras no supera, en ningún caso, las cuatro horas.

## **3º.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO.**

### **3.1.- PROCESADO DE LA SANGRE:**

. **Obtención del plasma para el análisis hormonal:** la sangre se centrifuga en una centrífuga Minifuge RF (Heraeus) a 1.300 x g y a 4°C durante 20 minutos. El plasma se obtiene con una pipeta pasteur (Brand) y se introduce en tubos de

pequeños de 13 x 50 mm, que son tapados y sellados con parafilm (American Can Company). Cada tubo es identificado con una etiqueta en la que se registra el número de animal, el número de la alícuota y la fecha de recolección.

- **Almacenamiento y conservación del plasma obtenido:** el plasma se conserva a -30°C en un congelador, hasta la realización de los análisis hormonales.

### **3.2. PROCESADO DE LOS OVARIOS.**

Los ovarios se extraen de las bolsas de plástico y se colocan en una placa Petri de cristal con solución salina a 4°C, procediéndose a su clasificación según el método descrito por Ireland et al. (1980), seleccionándose los ovarios que se encontraban en fase lútea tardía (cuerpo lúteo no funcional) y en fase folicular. Después, se procede a la eliminación de los tejidos circundantes con el fin de limpiarlos perfectamente. Una vez limpios se colocan en otra placa para comenzar su estudio. En ambos ovarios se llevan a cabo las siguientes manipulaciones:

3.2.1. **Determinación del peso en balanza de precisión (Mettler H72):** los ovarios se pesan en fresco, eliminando en lo posible el exceso de humedad.

3.2.2. **Determinación de la longitud y anchura con calibre Vernier (Microscopio).**

3.2.3. **Clasificación de los folículos según tamaño:**

Folículos T1: folículos de 0 a 2 mm de diámetro.

Folículos T2: folículos de 2 a 5 mm de diámetro.

Folículos T3: folículos de 0 a 5 mm de diámetro.

Folículos T4: folículos de 5 a 10 mm de diámetro.

Folículos T5: folículos de 10 a 20 mm de diámetro.

**Folículos T6:** folículos de más de 20 mm de diámetro.

Esta clasificación se realiza midiendo el diámetro externo del folículo (intersección del folículo con la superficie del ovario) con un calibre de precisión Vernier. Se toma como medida correcta la media de dos o tres mediciones.

3.2.4. Obtención del líquido folicular, mediante la punción de la pared de los folículos con una aguja de 0,5 x 16 mm (25 G x 5/8"), aspirando con una jeringuilla estéril, tipo insulina (1 ml, Ico). El líquido folicular se clasifica de acuerdo con el tamaño del folículo. En los folículos de los tipos 1 y 3 se realiza un "pool" del líquido folicular de cada ovario, debido a que el volumen obtenido de cada uno de ellos es tan pequeño que se hace imposible su análisis por separado. El líquido folicular, del resto de los tamaños foliculares de nuestra clasificación, se analiza independientemente, por lo que se introduce en tubos de plástico a los que se les añade una concentración de citrato trisódico al 50%, de 25  $\mu$ l/ml de líquido folicular para impedir su coagulación.

Los tubos que contienen el líquido folicular se etiquetan para su correcta identificación. En la etiqueta se incluye el número de animal, la identificación del folículo, los ml de líquido folicular, la situación del ovario (derecho o izquierdo) y la fecha.

Estos tubos se taponan y sellan con parafilm, conservándose en un congelador, a -30° C, hasta su análisis.

Se crea una ficha para cada animal en la que se anotan todos los datos obtenidos de ambos ovarios: Parámetros ováricos, clasificación de folículos, volumen de líquido folicular obtenido en cada folículo, etc. Esta ficha se complementa con los parámetros fisiológicos de cada hembra, como por ejemplo: estado de salud, estado reproductor, etc.



**C) ANALISIS HORMONAL DE LAS MUESTRAS DE PLASMA Y LIQUIDO FOLICULAR: DETERMINACION POR ENZIMOINMUNOANALISIS, ELISA DE COMPETICION.**

Se utiliza el enzimoimmunoandlisis, ELISA de competición para la determinación de las hormonas esteroides progesterona, estradiol-17 $\beta$  y testosterona.

Es necesaria una estandarización, o puesta a punto, previa del método para adaptarlo a las determinaciones hormonales que se quieren realizar (en plasma y líquido folicular). La estandarización se realiza en varias etapas:

- I.- Producción de anticuerpos policlonales frente a cada una de las hormonas esteroides.
- II.- Purificación de los anticuerpos policlonales producidos.
- III.- Caracterización de los anticuerpos purificados.
- IV.- Conjugación de las hormonas esteroides a la enzima marcadora.
- V.- Caracterización de los conjugados.
- VI.- Estandarización propiamente dicha del método ELISA de competición.
- VII.- Procesado de resultados.

## I. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A ESTRADIOL-17 $\beta$ , PRÓGESTERONA Y TESTOSTERONA.

### **I.1. Elección de la especie animal Idónea para la producción de anticuerpos policlonaes:**

La especie animal elegida es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

Para el proceso de inmunización se utilizan seis conejos machos de raza Nueva Zelanda, de la variedad blanca, que se mantienen desde edades comprendidas entre los dos y tres meses con 2,5 - 2,8 kg de peso. Los animales fueron suministrados por Granjas Jordi (Barcelona) y a su llegada se les somete a un examen detenido de su estado de salud (pelo, piel, coloración de mucosas, extremidades, presencia de mucosidad en fosas nasales, heces, temperatura corporal, etc). Asimismo se les pesa y sexa, en prevención de algún tipo de equivocación. Se comprueba que los pesos oscilan entre los 2,5 y los 2,8 Kg.

Pasado este tiempo de cuarentena (48 h) se les introduce en su alojamiento definitivo y allí se les tiene diez días en observación, para comprobar que la adaptación a las condiciones de alojamiento, alimentación y bebida es correcta.

#### **Condiciones de alojamiento:**

Los animales se introducen en una habitación, de ambiente controlado. Las condiciones de alojamiento son las siguientes:

- **Jaulas:** Se utilizan jaulas metálicas individuales de 42 x 61 x 35 cm. Estas jaulas están provistas de bebederos automáticos, con la posibilidad de adaptar un biberón en el caso de que fuese necesario.

Todas las jaulas poseen una etiqueta de identificación en la que se va registrando todo tipo de manipulación que se realiza a los animales.

- Temperatura: 20-22°C.
- Humedad relativa del ambiente: 45-55%.
- Renovación del aire: de diez a quince cambios por hora.
- Iluminación:
  - a) Ciclo horas de luz/ horas de oscuridad: 12/12.
  - b) Intensidad: 350-400 lux.

- **Alimentación:** Los animales son alimentados con pienso especial para conejo en forma de pellets. La administración fue "ad libitum" hasta que alcanzaron los 3,5 Kg, momento en que se les restringe el alimento a 250 g diarios, ración que satisface con creces sus necesidades nutritivas e impide un engorde excesivo.

- **Agua:** El agua de bebida se administra siempre "ad libitum". El buen funcionamiento de los bebederos se comprueba diariamente.

Los animales se pesan semanalmente y cuando alcanzan los 3,5 Kg se comienza el proceso de inmunización, empleándose dos animales por hormona.

## 1.2 - Inmunógenos y Adyuvantes:

Los inmunógenos elegidos para el proceso de inmunización son:

- 4-Androsten-17 $\beta$ -O1-3-Ona 3CMO:BSA.  
Con una relación de 23 moles de esteroide: mol de BSA.
- 6-Ceto-17 $\beta$ -Estradiol 6CMO:BSA.  
Con una relación de 25 moles de esteroide: mol de BSA.

- 4-Pregnen-11 $\alpha$ -Ol-3,20 diona Hemisuccinato:BSA.  
Con una relación de 22 moles de esteroide: mol de BSA.  
Todos los inmunógenos son suministrados por Steraloids Inc.

**Adyuvantes:** Se utilizan como adyuvantes el completo e incompleto de **Freund (ACF y AIF)**.

- *Bordetella pertussis*, como potenciador de la producción de anticuerpos.

### **1.3 - INMUNIZACION DE LOS ANIMALES.**

La inmunización de los animales seleccionados se lleva a cabo siguiendo la pauta de inmunización descrita por Vaitukaitis (1971) y Munro y Stabenfeldt (1984), introduciendo las modificaciones oportunas.

Este proceso consta de las siguientes etapas:

- 1º Preparación de los inmunógenos.
- 2º Preparación de los animales para la inmunización.
- 3º Método y Pauta de inmunización: inyecciones, sangrías, inyecciones de recuerdo o boosters, etc.
- 4º Determinación del título de anticuerpos a lo largo del período de inmunización:
  - a) Inmunodifusión doble de Ouchterlony.
  - b) ELISA F.I.S.,



## 1ª PREPARACION DE LOS INMUNOGENOS.

Los inmunógenos se preparan de acuerdo con el método de Moura y Stabenfeldt (1984). El primer paso consiste en disolver cada uno de los conjugados inmunizantes en solución salina a una concentración de 1 mg de conjugado hormona.BSA/ml de solución salina al 0,85%.

La cantidad de conjugado inmunizante que se inyecta es de 1 mg, por lo que 1 ml de esta solución se emulsiona con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (1 ml).

Cuando la mezcla adquiere una consistencia apropiada, se deja reposar unos minutos para comprobar que la emulsión sea totalmente homogénea y que la fase acuosa no se separe.

### **Material.**

- Jeringuillas estériles de polipropileno de 2 ml de cono luer. Ico.
- Conector de jeringuillas de cono luer. Sigma.
- Aguja estériles de 0.8 x 25 mm (21 G x 1"). Ico.
- Inmunógenos. Steraloids Inc.
- Adyuvantes completo e incompleto de Freund: Difco.
- NaCl. Probus.
- Agua purificada. Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria.
- Solución Salina 0,85%.
- *Bordetella pertussis*. Wellcome.

## 2º PREPARACION DE LOS ANIMALES PARA LA INMUNIZACION.

Para cada hormona se utilizan dos animales. Todos ellos son pesados antes de comenzar la inmunización en una báscula (Mobba). Los pesos se situaron entre 1,4 y 1,6 kg. Estas pesadas se repiten cada vez que se les realizan las inyecciones del inmunógeno y las extracciones de sangre.

Una vez pesados se procede a rasurar todo el dorso del animal con una máquina eléctrica (Ooster) ya que el método de inmunización que se va a utilizar así lo requiere.

Para la inyección del inmunógeno, los animales se colocan en una caja de plástico duro transparente (cepo) y, antes de cada inyección, la piel se desinfecta con etanol (96%) (Prolabo).

## 3º METODO Y PAUTA DE INMUNIZACION.

El método de inmunización consiste en realizar una serie de inoculaciones intradérmicas de muy pequeño volumen (0,1 ml) en el dorso del animal. Con este método y gracias a la propiedad del adyuvante completo de Freund de formar una serie de pequeños granulomas asépticos, ricos en macrófagos y en células inmunocompetentes, se consigue aumentar la respuesta inmunológica del animal inmunizado.

En la primera inmunización se inoculan 2 ml de la emulsión inmunógeno-adyuvante completo, preparada con anterioridad, de tal manera que la cantidad de inmunógeno administrada es de 1 mg. Los 2 ml de emulsión se reparten en 20 inoculaciones de 0,1 ml cada una, siguiendo un orden determinado en el dorso de cada animal. Para la inyección del inmunógeno se utilizan agujas de 0,6 x 25 mm (23 G x 1").

En cada punto de inoculación se forma un pequeño abultamiento, lo que indica que la inyección se ha realizado adecuadamente. Estos pequeños granulomas son observados diariamente, para comprobar su progresiva disminución de tamaño, con lo que el inmunógeno inoculado está siendo liberado de manera adecuada. En el caso de la rotura de alguno de estos granulomas, el animal fue tratado con una solución antiséptica (Vioformo, Ciba Geigy), para impedir la infección del mismo.

En esta primera inmunización se administran intramuscularmente 0,5 ml de *Bordetella pertussis*. Esta endotoxina produce un mayor estímulo de los linfocitos B, reforzando la respuesta inmunológica de esta primera inmunización.

**CALENDARIO O PAUTA DE INMUNIZACION:** La pauta de inmunización es la misma para todos los animales y para cada hormona.

Se realizan cuatro administraciones de 1 mg de inmunógeno disueltos en solución salina y emulsionado en adyuvante completo de Freund con un intervalo de dos semanas cada una.

Una semana después de cada inoculación se extraen 10 ml de sangre con el fin de determinar el título de anticuerpos que se va consiguiendo.

La primera sangría se realiza a los diez días de la cuarta inoculación, después de determinar que el título de anticuerpos obtenido es suficiente para empezar su purificación.

El primer booster o inyección de recuerdo, se administra un mes después de la cuarta inmunización. Este booster está compuesto por 1 mg de inmunógeno disueltos en solución salina y emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. Una semana después se realiza la segunda sangría.

En total se administran cuatro boosters, separados unos de otros un mes. La composición de estos boosters es la misma que la del primero administrado.

*Una vez conseguido un título estable de anticuerpos se realizan sucesivas sangrías, separadas unas de otras una semana, hasta un total de 12 sangrías por animal.*

Estas extracciones se llevan a cabo según el método de Illera et al. (1989) a partir de la arteria central de la oreja.

En cada extracción se obtienen 40 ml de sangre por animal sin que sufra ninguna alteración en sus constantes fisiológicas, lo que se comprobó realizando una analítica sanguínea: recuento de eritrocitos y leucocitos, fórmula leucocitaria, hematocrito y bioquímica sanguínea (hemoglobina, glucosa, bilirrubina, creatinina, ALAT, ASAT, etc.)

#### **OBTENCION Y ALMACENAMIENTO DEL PLASMA PROCEDENTE DE LOS ANIMALES INMUNIZADOS.**

*La sangre recogida en cada extracción se centrifuga en una centrífuga refrigerada Minifuge RF (Heraeus), a 4°C, a una velocidad de 1.300 x g durante 20 minutos. El volumen de plasma obtenido es el 60% del volumen inicial de sangre, por lo que se puede considerar que el rendimiento conseguido es óptimo.*

Este plasma se introduce en tubos de plástico estériles (15 x 35 mm) que se taponan e identifican convenientemente. El plasma se conserva a -30°C hasta el momento de su purificación.

#### **1.4 - DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS A LO LARGO DEL PERIODO DE INMUNIZACION.**

La determinación del título de anticuerpos que se van produciendo a lo largo de la inmunización, se lleva a cabo por dos métodos:

a) Inmunodifusión doble de Ouchterlony.

b) ELISA F.I.S.

**a) INMUNODIFUSION DOBLE DE OUCHTERLONY:** Para su realización, se utilizan placas Petri, de poliestireno, estériles, de 35 x 12 mm (Nunc). El gel utilizado es Agarosa A, que se prepara a una concentración del 0,9% en solución salina al 0,85%. La Agarosa se licúa al baño María a una temperatura de 90°C, impidiendo la formación de grumos. Posteriormente se deja reposar hasta que la temperatura disminuye a 60°C, momento en el que se depositan 10 ml de agarosa en el fondo de las placas Petri. Para conseguir que el gel se expanda uniformemente sobre el fondo de las placas, éstas se colocan en una superficie plana, perfectamente nivelada. Las placas se tapan para impedir que sobre ellas se deposite polvo o cualquier otro tipo de material, hasta que la agarosa se solidifica totalmente. El espesor de la agarosa es de 1-2 mm. Se perforan, con ayuda de un cilindro hueco, una serie de pocillos con capacidad de 10 µl cada uno: un pocillo central y seis periféricos, separados unos de otros 15 mm.

En el pocillo central se depositan 10 µl de antígeno, es decir, los conjugados hormona-BSA utilizados en la inmunización, a una concentración de 1 mg/ml. En los periféricos se depositan 10 µl de plasma de los conejos inmunizados a las siguientes diluciones, en solución salina al 0,85%: 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500; en el pocillo restante se deposita el plasma sin diluir.

Las placas Petri se colocan dentro de un desecador cuyo fondo se llena de azida sódica al 2% (Merck) para impedir la proliferación de microorganismos y se deja difundir a temperatura ambiente durante 48 horas. Pasado este tiempo, se observan las líneas de precipitación formadas y se evalúa el título obtenido.

### **Preparación del Gel de Agarosa al 0,9%:**

#### **Reactivos:**

- Agarosa A. Pharmacia.
- Solución salina al 0,85%.

Se preparan 20 ml de gel, para lo que se pesan 18 mg de agarosa que se disuelven en solución salina al 0,85%. El volumen se ajusta a 20 ml en un matraz aforado (Durán).

#### **b) ELISA DIRECTO (E.I.S.):**

Este método ha sido desarrollado por nosotros y con él es posible conocer el título de los antisueros que se van produciendo a lo largo del proceso de inmunización de una manera sencilla y directa. El título de un antisuero lo podemos definir como la dilución más alta que resulta óptima para el desarrollo de un método específico (en nuestro caso para el desarrollo del enzimoimmunoanálisis), produciendo la mínima reacción inespecífica de fondo (Boenisch, 1989).

**Material:** El material utilizado para el desarrollo de esta técnica es el siguiente:

- Placas ELISA de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech)
- Tapas de poliestireno para placas ELISA (Dynatech).
- Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100  $\mu$ l y de 100-1.000  $\mu$ l.
- Pipeta multicanal de ocho canales, de 50-250  $\mu$ l (Costar).
- Vórtex: Reax 2.000 (Heindolph).
- Pipetas de cristal de doble enrase de 1, 5 y 10 ml (Protón)

- Parafilm (American Can Co).
- Tubos de ensayo de cristal de 25 x 75 mm y de 25 x 150 mm. (Durán).
- Puntas, de un solo uso, para pipetas Eppendorf, de 10-200  $\mu$ l y de 100-1.000  $\mu$ l (Comfortips, Eppendorf).
- Puntas de pipeta multicanal, 25-250  $\mu$ l (Costar).
- Lector automático ELISA (Eurogenetics).

#### **Reactivos:**

- **Conjugados hormona-peroxidasa:** conjugado de progesterona, conjugado de estradiol-17 $\beta$  y conjugado de testosterona. Todos ellos son preparados y caracterizados por nosotros siguiendo el procedimiento que se detallará más adelante.
- **Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )** al 30% y 110 vol (Panreac).
- **Ortótolidina-diamina dihidroclorhidro (OPD):** tabletas de 10 mg (Sigma).
- **Soluciones tampón:** Las soluciones tampón son las mismas que se utilizan en el ELISA de competición y su composición y realización se detallarán más adelante.
- **Plasma de los animales inmunizados frente a progesterona, estradiol-17 $\beta$  y testosterona.**

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA:** La técnica está basada en la inmovilización de una serie de diluciones del plasma de los animales inmunizados, en un soporte sólido inerte (pocillos de la microplaca). Se añade el conjugado hormona-enzima, en una dilución fija. Después se añade la mezcla del sustrato y el cromógeno, de tal manera que al ser hidrolizado este sustrato se producirá un color cuantificable en el lector ELISA.

Las diluciones de plasma que se utilizan son: 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1.000, también se tapizan algunos pocillos con el plasma sin diluir. Estas

diluciones se realizan en tubos de ensayo de 15 x 50 mm y de 15 x 100 mm, con agua purificada.

Los pocillos de la placa ELISA se tapizan con 100  $\mu$ l de estas diluciones y se mantienen a 37°C durante 16 horas, pasadas las cuales la placa se vuelca y se practican tres lavados para eliminar el material que no haya quedado adsorbido.

Una vez secos los pocillos se añade el conjugado a una dilución de 1/10.000. Esta dilución se realiza en solución tampón EIA: se depositan 50  $\mu$ l de solución tampón EIA, inmediatamente se añaden 50  $\mu$ l de conjugado y se incuba en la oscuridad durante dos horas. Después de este tiempo, la placa se vuelca y se lava cinco veces con solución de lavado. A continuación se añade el sustrato (100  $\mu$ l) con el cromógeno y se incuba otra hora en la oscuridad, a temperatura ambiente.

La densidad óptica, del color desarrollado se mide en un lector automático ELISA a 450 y 600 nm, observándose que cuanto mayor es la dilución del plasma, lo que según el criterio de Boenisch (1989) corresponde al título del antisuero, más color se desarrolla.

Se considera un título óptimo para empezar la purificación del antisuero, a partir de 1/500.

## **II. PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.**

---

Una vez finalizada la inmunización y sabiendo que existe un buen título de anticuerpos policlonaes, se procede a su purificación, empleando los siguientes métodos:

- A) Fraccionamiento de los antisueros de conejo mediante la precipitación salina del plasma con sulfato amónico saturado.



- B) Diálisis y Gel-filtración de los antisueros precipitados para eliminar los iones sulfato.
- C) Adsorción de las gammaglobulinas anti-BSA.

### A) FRACCIONAMIENTO DE LOS ANTISUEROS DE CONEJO MEDIANTE LA PRECIPITACION SALINA DEL PLASMA CON SULFATO AMONICO SATURADO.

El fraccionamiento de los antisueros, presentes en el plasma de los conejos, se realiza mediante la precipitación salina del mismo con sulfato amónico saturado (Garvey et al., 1977).

**1ª Preparación del sulfato amónico saturado:** Solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4,1M saturada al 100% a 25°C: se disuelven 76,7 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck) en 100 ml de agua purificada, ajuste del pH a 7,4 con  $\text{OHNa}$  2M.

**2ª Precipitación salina del plasma de los conejos inmunizados:** Se realiza a un tercio de saturación, por ser este porcentaje de sulfato amónico el óptimo para esa especie (Hebert et al., 1973).

A 20 ml de plasma, de los distintos animales, se les añaden 10 ml del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (saturado al 100%), gota a gota, con agitación constante, para lograr una mezcla homogénea con el plasma.

La mezcla se mantiene en agitación durante dos horas, después se centrifuga a temperatura ambiente a  $1.200 \times g$  durante 20 minutos, obteniéndose un precipitado blanco. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 20 ml de solución salina, con el fin de restaurar el volumen inicial de plasma del que partimos al precipitar. En este primer precipitado se encuentran todas las gamma-globulinas, algún otro tipo de globulinas y un porcentaje mínimo de

albuminas.

Se realizan dos precipitaciones más con el fin de eliminar componentes del plasma no deseados y el tercer precipitado se disuelve en 10 ml de solución tampón borato-salina.

### **REACTIVOS:**

- Ácido Bórico ( $H_3BO_3$ ). Merck.
- Sulfato Amónico ( $(NH_4)_2SO_4$ ). Merck.
- Hidróxido Sódico (NaOH). Merck.
- Tetraborato Di-sódico (Bórax) ( $Na_2B_4O_7$ ). Merck.
- Cloruro Sódico (NaCl). Probus.

**Solución tampón borato-salina:** Para 1.000 ml de solución:

- $H_3BO_3$ : 6,184 g.
- $Na_2B_4O_7$ : 9,536 g.
- NaCl: 4,384 g.
- Agua purificada: Enrasar a 1.000 ml.

**Solución salina 0,85%.**

**Solución 2M de Sodio Hidróxido.**

Mezclar cinco partes de la solución borato con 95 partes de solución salina.

El pH de la solución tampón borato-salina se ajusta a 8,5 con NaOH 2M, en un pHmetro (Crison).

## **B) DIALISIS Y GEL-FILTRACION DE LOS ANTISUEROS PRECIPITADOS CON EL FIN DE ELIMINAR LOS IONES SULFATO.**

La eliminación del exceso de iones sulfato del antisuero se realiza por dos métodos: Diálisis exhaustiva y Gel-filtración.

1º Diálisis: se utilizan membranas de diálisis de 33 x 21 mm (Sigma). Los poros de esta tripa poseen un diámetro suficiente como para que los iones sulfato libres la puedan atravesar, reteniendo en su interior moléculas de elevado peso molecular como las inmunoglobulinas.

Previamente son lavadas con agua, introduciéndolas en un vaso de precipitado de 100 ml durante tres horas.

Una vez lavada, la membrana se introduce en otro vaso de precipitado de cristal que contiene solución tampón borato-salina, ya que no se debe secar nunca, porque los poros se obstruirían. Se cierra por un extremo con seda, anudándola perfectamente para evitar pérdidas del anticuerpo con el que vamos a llenar la tripa. Se insufla aire, de esta manera la membrana se hincha y con la ayuda de una pipeta pasteur se llena con la solución que contiene los anticuerpos. Se cierra con seda, anudándola perfectamente y se coloca suspendida en el interior de un vaso de precipitado de cristal de 1.000 ml, que contiene tampón borato-salina, solución frente a la que se realiza la diálisis. La temperatura a la que se dializan los antisueños es de 4°C, con dos cambios de líquido al día (mañana y tarde). Los anticuerpos se dializan durante 48 horas.

Es importante medir el pH del líquido de diálisis, ya que ésta debe realizarse con un pH ligeramente alcalino pues de lo contrario los anticuerpos podrían desnaturalizarse.

Finalizada la diálisis, los anticuerpos se sacan de las membranas y se introducen en tubos de centrifuga, para eliminar el material insoluble formado.

mediante centrifugación durante 30 minutos a 4°C a 1.300 x g.

**2ª Gel-filtración:** Para lograr una total eliminación de los iones sulfato que hayan podido quedar después de la diálisis se emplea la Gel-filtración. Este método está basado en la separación o fraccionamiento de moléculas contenidas en una muestra que difieran totalmente en tamaño, mediante el uso de un gel apropiado. Las moléculas grandes atravesarán o se filtrarán a través del gel apareciendo intactas o lográndose una recuperación del 100% de las mismas después de la filtración, mientras que las moléculas de pequeño tamaño (como por ejemplo los iones sulfato) quedan retenidas en las mallas del gel y son filtradas posteriormente.

El gel que se utiliza para esta Gel-filtración es Sephadex G-25 (Pharmacia).

**Preparación del gel:** De acuerdo con las características del gel, el tamaño de la muestra y la gel-filtración que se va a realizar, se calculan los gramos necesarios de gel seco:

- Un gramo de gel seco corresponde a 4 ml de gel hinchado.
- Se debe calcular los ml de lecho en función de que la muestra a eluir representa el 30% del volumen de la misma.

El volumen de gel necesario es 33,3 ml, equivalente a 8 g de gel seco.

El gel seco, se introduce en un vaso de precipitado de 100 ml al que añadimos 50 ml de agua purificada. El gel se deja así durante tres horas, removiéndolo de vez en cuando muy suavemente, con una varilla de vidrio para no romper los gránulos y que el hinchamiento sea homogéneo.

**EMPAQUETADO DE LA COLUMNA:** La columna cromatográfica se coloca en posición vertical. El extremo inferior de la columna se cierra y por el superior se procede a llenar el fondo con el tampón de elución. Se comprueba que no queda

ninguna burbuja de aire en el interior del espacio llenado y se empieza a introducir el gel. Antes de comenzar a empaquetarlo, se elimina una determinada cantidad de líquido del gel, de tal manera que éste adquiera una consistencia espesa. El gel se introduce con la ayuda de una pipeta de cristal especial para Agar, hasta llenar toda la columna. En ese momento, se conecta el extremo inferior a la bomba peristáltica y el superior a un recipiente que contiene el tampón de elución. El flujo se ajusta a 30 ml/hora hasta que se comprueba que la columna ha quedado completamente empaquetada y que no se observa, en su interior, la formación de burbujas de aire.

El tampón de elución utilizado es solución tampón borato-salina de pH = 8,5.

**EQUILIBRADO DE LA COLUMNA:** La columna se equilibra dejando pasar tres volúmenes de tampón de elución, utilizando un flujo de 60 ml/hora. Después se mide el pH del eluyente y cuando se comprueba que es igual al del tampón de elución, se procede a pasar la muestra.

**GEL-FILTRACION PROPIAMENTE DICHA:** La gel-filtración se realiza utilizando un equipo de cromatografía líquida de baja presión (Isco), compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba peristáltica Tris de dos vías.
- Detector de absorbancias  $V_{\lambda}$  que abarca los espectros visible y ultravioleta.
- Colector de fracciones Retriever II.
- Tubo de sílica de 2 mm de diámetro para conectar todos los elementos. Maquinsa.

Consta de dos fases:

a) Aplicación de la muestra a la columna.

b) Elución de la muestra.

a) Aplicación de la muestra a la columna:

La columna se abre por el extremo superior y se elimina todo el líquido hasta el borde superior del gel. Se añade gota a gota la muestra con una pipeta Pasteur, dejándola resbalar por las paredes, para evitar la formación de turbulencias en el interior. La muestra se deja caer por gravedad en el espesor del gel, posteriormente se vuelve a llenar la columna con tampón de elución hasta el borde superior, se cierra y se conecta a un recipiente que contiene el tampón de elución.

b) Elución de la muestra:

Se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

Velocidad de flujo: 50 ml/hora

Tampón de elución: borato-salina de pH= 8,5

Longitud de onda del registro: 280 nm

Amplitud de banda del espectrofotómetro: 2 nm

Volumen de eluido recogido en cada tubo: 10 ml.

Con estas condiciones de elución toda la muestra queda contenida en un tubo, con lo que la recuperación de la misma es del 100%.

## PRUEBA DEL CLORURO DE BARIO.

Esta prueba sirve para comprobar la ausencia de iones sulfato en el eluido. Se recogen 3 ml de eluido de los tubos anterior y posterior, al que contiene la muestra y se le añaden 6 gotas de  $\text{Ba}_2\text{Cl}$  al 10% (Merck). La aparición de una turbidez blanca o de un pequeño precipitado del mismo color, nos indica la presencia de iones sulfato en el eluido, pero como eso no ocurrió, podemos apreciar que nuestra muestra está libre de esos iones.

## C) ADSORCION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-BSA.

El último paso en la purificación de los anticuerpos producidos frente a progesterona, estradiol-17 $\beta$  y testosterona, es la eliminación de una pequeña fracción de anticuerpos producidos frente a la proteína transportadora (BSA) incluida en los conjugados inmunizantes. Estos anticuerpos pueden producir una interferencia inespecífica en los sistemas de micro-fase sólida (Thornycroft et al., 1970). La eliminación de esta fracción de anticuerpos se efectúa mediante la adsorción de los mismos con una cantidad fija de BSA que se añade a los tubos que contienen los distintos anticuerpos.

### REACTIVOS:

- Albúmina sérica bovina (BSA). Sigma.
- Solución tampón borato-salina.
- Anticuerpos anti-progesterona, anti-estradiol-17 $\beta$  y anti-testosterona.

Para determinar la concentración idónea de BSA para adsorber la mayor fracción de anticuerpos anti-BSA, se añaden cantidades variables de la misma a una serie de tubos de 25 x 75 mm, que contienen 0,5 ml de anticuerpo. Las concentraciones de BSA que se añaden son las siguientes: 20,00; 10,00; 2,00; 1,00; 0,20; 0,10 y 0,02 mg/ml de tampón borato-salina. Se mezclan 0,5 ml de cada dilución con 0,5 ml de anticuerpo. Se realizan dos incubaciones: la primera a 37°C

durante una hora y la segunda 48 horas a 4°C. Posteriormente, los tubos se centrifugan a 1.200 x g durante 30 minutos, observándose la formación de un precipitado blanco en el fondo del tubo. Se selecciona el tubo que contiene el precipitado más grande, utilizándose esa concentración de BSA para adsorber los anticuerpos anti-BSA. La concentración seleccionada fue la correspondiente a 0,02 mg BSA/ml.

El precipitado blanco formado contiene los anticuerpos anti-BSA que reaccionan con el BSA añadido, por lo que se descarta. El sobrenadante contiene los anticuerpos purificados ya libres de anticuerpos anti-BSA.

### **III.- CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS PURIFICADOS**

#### **III.1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA DE LOS ANTICUERPOS PURIFICADOS: METODO DE BRADFORD.**

La determinación del rendimiento o concentración proteica de los anticuerpos purificados se realiza por el método de Bradford (1976).

Es un método colorimétrico basado en el cambio de coloración que sufre el azul brillante Coomassie G-250, en su variedad de color rojo. Este colorante vira a azul al unirse con las proteínas. El complejo colorante-proteína posee un elevado coeficiente de extinción, conduciendo a una gran sensibilidad para la medida de las proteínas.

La formación de este complejo es muy rápida, aproximadamente de 2 minutos y permanece estable, al menos, durante una hora. Esta reacción se puede cuantificar midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro.



### **Reactivos:**

- Albúmina sérica bovina Fracción V de Cohn (BSA). Sigma.
- Ácido Orto-fosfórico 85% ( $H_3PO_4$ ). Merck.
- Azul brillante Coomassie G-250. Bio-Rad.
- Etanol 95%. Merck.
- Filtro de 0,8  $\mu m$ . Millipore.

### **Preparación del azul brillante Coomassie:**

1º. Se disuelven 100 mg de azul brillante Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. La disolución se efectuó en caliente, para evitar la formación de grumos, durante 30 minutos como mínimo, con la ayuda de un agitador magnético (Dunnen).

2º. Adición de 100 ml de  $H_3PO_4$ , 85% y ajuste del volumen a 1.000 ml con agua purificada.

3º. Filtrado a través de un filtro de 0,8  $\mu m$  y se deja enfriar.

### **Preparación de las muestras estándar de proteína:**

Las muestras estándar de proteína se preparan con albúmina sérica bovina (BSA).

La albúmina sérica bovina se disuelve en tampón borato-salina, el mismo en el que están diluidas las muestras problema y a partir de una solución madre de 2 mg/ml se realizan las siguientes diluciones:

- 0,05; 0,1; 0,25 y 0,5 mg/ml.

#### Método:

Para la realización del ensayo se utilizan tubos de 13 x 100 mm. En el interior de cada tubo se añaden 100  $\mu$ l de cada estándar y 100  $\mu$ l de las muestras que van a ser analizadas. Inmediatamente después se añaden 2 ml de azul brillante Coomassie y se mezcla en un vórtex durante 20 segundos. Una vez mezclados se dejan estabilizar durante dos minutos, antes de proceder a su lectura en un espectrofotómetro.

Para la lectura se utilizan cubetas cromatográficas de vidrio de 3 ml (Shimadzu). El blanco utilizado consiste en una mezcla de 100  $\mu$ l de tampón borato-salina y 5 ml de azul brillante Coomassie. La lectura se realiza a 595 nm.

La curva estándar se construye enfrentando las concentraciones conocidas de proteína (mg/ml) con la correspondiente absorbancia medida. Las muestras problema se refieren a esta curva estándar para determinar su concentración de proteína.

#### III.2. DETERMINACION DEL TITULO DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A PROGESTERONA, ESTRADIOL-17 $\beta$ Y TESTOSTERONA DESPUES DE LA PURIFICACION.

El título de los anticuerpos obtenidos después de la inmunización y purificación, se determina mediante su practicabilidad en el ELISA, utilizando diluciones variables de anticuerpo y de conjugado hormona-enzima. Se considera como título la dilución que presente una absorbancia de 0,6-0,8 a 450 nm (Munro y Stabenfeldt, 1984).

- Las diluciones de anticuerpo que se emplean en todos los casos son:  
1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000 y 1/8.000.

- Las diluciones de conjugado hormona-enzima son: 1/10.000, 1/20.000, 1/40.000 y 1/80.000.
- La metodología es igual a la que detallaremos posteriormente para determinar las diluciones óptimas de conjugado y anticuerpo en ELISA.

### **III.3. PRUEBAS DE REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROGESTERONA, ANTI-ESTRADIOL Y ANTI-TESTOSTERONA**

Se realizan pruebas de reactividad cruzada, de los anticuerpos policlonales para comprobar la especificidad del anticuerpo producido, frente a otras hormonas esteroides. Estas pruebas se llevan a cabo mediante ELISA de competición, cuyo desarrollo y puesta a punto detallaremos en un capítulo posterior.

Los esteroides que se emplean para la realización de estas pruebas de reactividad cruzada son:

#### **1º Para los anticuerpos anti-progesterona:**

- 4-Pregnen-3,6-diona (Progesterona).
- 5 $\beta$ -Pregnan-3,20-diona (Pregmandiona).
- 4-Pregnen-11 $\alpha$ -ol-3,20-diona (11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona).
- 4-Pregnen-17 $\alpha$ -ol-3,20-diona (17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona).
- 4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-ona (20 $\alpha$ -Dihidroxiprogesterona).
- 4-Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-ona (20 $\beta$ -Dihidroxiprogesterona).
- 4-Pregnen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-diona (Cortisol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol (Estradiol-17 $\beta$ ).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (Estriol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-ona (Estrona).
- 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-ona (Testosterona).

**2º Para los anticuerpos anti-estradiol-17β:**

- 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol (Estradiol-17β).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,17α-diol (Estradiol-17α).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol 3-benzoato (Estradiol-17β 3-Benzoato).
- 1,3,5(10),7-Estratetraen-3-ol-17-ona (Equilina).
- 1,3,5(10)-Estratrien-2,3,17β-triol (2-Hidroxiestradiol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,6α,17β-triol (6α-Hidroxiestradiol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-6-ona (6-Ceto-Estradiol-17β).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-16-ona (16-Ceto-Estradiol-17β).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,16α,17β-triol (Estriol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-ona (Estrona).
- 4-Pregnen-11β,17α,21-triol-3,20-diona (Cortisol).
- 4-Pregnen-3,6-diona (Progesterona).
- 4-Androsten-17β-ol-3-ona (Testosterona).

**3º Para los anticuerpos anti-testosterona:**

- 4-Androsten-17β-ol-3-ona (Testosterona).
- 4-Androsten-3,17-diona (Androstenodiona).
- 4-Androsten-17α-ol-3-ona (Epitestosterona).
- 3α-Androstan-3α,17β-diol (Dihidroandrosterona).
- 5α-Androstan-3β,17β-diol.
- 5α-Androstan-17β-ol-3-ona (5α-Dihidrotestosterona).
- 5β-Androstan-17β-ol-3-ona (5β-Dihidrotestosterona).
- 5-Androsten-3β-ol-17-ona (Androstenolona).
- 5-Androsten-3β,17β-diol (Androstenediol).
- 4-Pregnen-11β,17α,21-triol-3,20-diona (Cortisol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3,16α,17β-triol (Estriol).
- 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-ona (Estrona).
- 4-Pregnen-3,6-diona (Progesterona).

La reactividad cruzada que presenta un anticuerpo específico para un esteroide, frente a otro esteroide cualquiera, la podemos definir como la concentración del esteroide problema que causa una reducción del 50% de la unión inicial al anticuerpo (Bo), dividida por la concentración del esteroide que presenta la reacción cruzada y que causa la misma reducción de la unión al anticuerpo (50%) (Abraham, 1975).

$$R.C. = \frac{\text{ng esteroide problema (E2, P4 o T) al 50\% de unión}}{\text{ng de esteroide al 50\% de unión}} \times 100$$

Para la realización de las pruebas de reactividad cruzada se emplea un rango de concentración de 0 a 5 ng de esteroide/pocillo: 0, 10 pg, 50 pg, 100 pg, 500 pg, 1 ng y 5 ng/ pocillo, para todas las hormonas testadas.

### CONSERVACION DE LOS ANTICUERPOS PURIFICADOS HASTA SU UTILIZACION.

La conservación de los anticuerpos se efectúa de dos maneras:

**1ª Conservación a corto plazo:** Mediante congelación. La mitad del volumen de cada uno de los anticuerpos purificados se congela en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf (Merek), a una temperatura de -30°C.

**2ª Conservación a largo plazo:** Mediante liofilización. El resto del volumen de cada anticuerpo se liofilizó. La liofilización se realizó en el Departamento de Reumatología de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Los anticuerpos liofilizados se conservan en un desecador a 4°C.

#### IV.- CONJUGACION DE LAS HORMONAS ESTEROIDES A LA ENZIMA MARCADORA.

La conjugación se realiza mediante una modificación del método de la mezcla anhidra (Dawson et al., 1978; Munro y Stabenfeldt, 1984).

El objetivo es la conjugación de la hormona esteroide a la peroxidasa a través de uniones peptídicas.

El grupo carboxilo de los derivados de las hormonas esteroideas, puede ser convertido en un ácido anhídrido que reacciona con los grupos amino de la proteína, siendo éste un método simple y directo, con el que se obtiene un alto rendimiento en la conjugación.

#### REACTIVOS:

- Peroxidasa de rábano picante (HRP): EC 1.11.1.1. Tipo VI, RZ = 3,2: Boehringer Mannheim.
- Esteroides. Steraloids Inc.:
  - 4-Pregnen-3,20-diona 3-O-Carboximetiloxima (Progesterona 3-CMO).
  - 1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol 3-Hemisuccinato (Estradiol-17 $\beta$  3-Hemisuccinato).
  - 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-ona 3-O-Carboximetiloxima (Testosterona 3-CMO).
- N,N'-Dimetilformamida purísima ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NOCH). Merck.
- 4-Metilmorfolina (C<sub>3</sub>H<sub>11</sub>NO). Merck.
- Isobutilcloroformiato (ClCOOCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Merck.

## METODOLOGIA:

La conjugación de los derivados esteroides a la peroxidasa se realiza en tres etapas:

- 1ª etapa: el derivado esteroide y un clorocarbonato se disuelven en un disolvente anhidro (dimetilformamida), a la mezcla se le añade una amina terciaria, para eliminar el ácido clorhídrico que se produce y formar la mezcla anhidra.

La enzima se disuelve en otro tubo.

- 2ª etapa: La mezcla anhidra se adiciona a la enzima muy lentamente bajo unas condiciones de temperatura muy determinadas.
- 3ª etapa: diálisis y gel filtración del conjugado.

La conjugación de las hormonas esteroides a la peroxidasa se realiza utilizando una proporción molar de 20 moles de esteroide/1 mol de peroxidasa, para lo que se calcula la siguiente relación:

- $5 \times 10^{-4}$  mmoles de peroxidasa.
- $1 \times 10^{-2}$  mmoles de esteroide.

### Conjugado de progesterona:

Se pesan:

- 20 mg de Peroxidasa, p.m. = 40.000.
- 3,875 mg de Progesterona 3-CMO, p.m. = 387,5.

**Conjugado de estradiol-17 $\beta$ :**

Se pesan:

- 20 mg de Peroxidasa, p.m. = 40.000
- 3,725 mg de Estradiol-17 $\beta$  3-Hemisuccinato, p.m. = 372,5

**Conjugado de testosterona:**

Se pesan:

- 20 mg de Peroxidasa, p.m. = 40.000
- 3,615 mg de Testosterona 3-CMO, p.m. = 361,5

La conjugación se realiza de la siguiente manera:

**SOLUCION A:**

- En un tubo de ensayo de cristal de 12 x 75 mm, se coloca el esteroide.
- Adición de 200  $\mu$ l de dimetilformamida, con agitación constante, hasta lograr la disolución completa del esteroide.
- Adición de 1,5  $\mu$ l de N-metilmorfolina y la mezcla se enfría a -15°C.
- Adición de 1,5  $\mu$ l de isobutilcloroformiato.
- Esta solución se mantiene en agitación constante a -15°C durante tres minutos.

**SOLUCION B:**

- En un tubo de ensayo de cristal de 12 x 75 mm, se coloca la peroxidasa.



- Adición de 200  $\mu$ l de agua purificada y 150  $\mu$ l de dimetilformamida con agitación constante.
- La mezcla se enfría hasta 0°C.

La solución A se añade a la B en fracciones de 10  $\mu$ l, siempre con agitación constante y a 0°C. La mezcla de las dos soluciones se mantiene en agitación durante una hora a -15°C y posteriormente dos horas a 0°C.

Adición de 2,00 mg de  $\text{NaHCO}_3$ .

Los conjugados se dializan frente a un litro de agua purificada durante 16 horas a 4°C, realizándose dos cambios de agua.

El esteroide libre, no incorporado a la enzima, se elimina del conjugado mediante una Gel-filtración en Sephadex G-25, de grado fino.

El método de gel filtración (preparación del gel, etc.) es similar al detallado anteriormente para la purificación de los anticuerpos, lo único que varían son las condiciones:

- Columnas de cromatografía de tipo Econo de 2,2 x 45 cm. Bio-Rad.
- Sephadex G-25 de grado fino. Pharmacia.
- Tampón de elución: Fosfato-salino 0,05 M, pH = 7,00.
- Flujo = 50 ml/hora.
- Fracciones de 1 ml (20 gotas) por tubo.
- Equipo de Cromatografía (Isco), compuesto de: detector  $V_{\lambda}$  de longitud de onda variable (espectros visible y ultravioleta), bomba peristáltica de dos canales y colector de fracciones.

Una vez finalizada la Gel-filtración se procede a la caracterización de las fracciones recogidas de los distintos conjugados.

## V. CARACTERIZACION DE LOS CONIUGADOS DE PROGESTERONA, ESTRADIOL-17 $\beta$ Y TESTOSTERONA.

La caracterización de la conjugación se realiza analizando tres aspectos:

1º) El rendimiento de la conjugación se determina mediante el cálculo de la incorporación molar del esteroide a la enzima. Para ello se utiliza el método de Habeeb (1966), modificado por Fields (1971) que consiste en la determinación de los grupos amino libres de la peroxidasa antes y después de la conjugación.

Es un método colorimétrico basado en el desarrollo de una coloración debida a la reacción del ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) con los grupos  $\epsilon$ -amino libres de una proteína. Esta determinación es lineal hasta una concentración de 1 mg/ml de proteína.

### REACTIVOS:

- Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) ( $C_6H_3N_3O_7 \cdot 5H_2O$ ). Sigma.
- n-Dodecilsulfato sal sódica (SDS) ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ). Merck.
- Sodio bicarbonato ( $NaHCO_3$ ). Merck.
- Ácido Clorhídrico (HCl). Merck.
- Agua purificada.
- Peroxidasa, RZ = 3,2. Boehringer Mannheim.
- Conjugados de progesterona, estradiol-17 $\beta$  y testosterona.

### SOLUCIONES:

- TNBS 0,1%
- SDS 10%.

-  $\text{NaHCO}_3$  4%

-  $\text{HCl}$  1N

- Solución de peroxidasa: Se disuelven 20 mg de peroxidasa en 150  $\mu\text{l}$  de dimetilformamida, 1.5  $\mu\text{l}$  de N-metilmorfolina y 1.5  $\mu\text{l}$  de isobutildicloroformato, se completa el volumen con agua purificada hasta 1 ml.

- Conjugados de hormonas esteroides: Se utiliza 1 ml de cada conjugado para realizar la determinación.

#### METODOLOGIA:

A 1 ml de solución de peroxidasa y 1 ml de cada conjugado, se añade 1 ml de la solución de  $\text{NaHCO}_3$  y 1 ml de la solución de TNBS.

Se incuba dos horas a  $40^\circ\text{C}$ .

Es necesario comprobar que el pH de la solución no descienda por debajo de 8.5, por cuanto el SDS interfiere la reacción.

Después se añade la solución de SDS para solubilizar la proteína, previniendo su precipitación mediante la adición de 0.5 ml de  $\text{HCl}$  1N.

La lectura se realiza en espectrofotómetro a 335 nm, utilizándose como blanco agua purificada.

2ª) Determinación de la actividad enzimática antes y después de la conjugación. Método de Joyce (1977). Se determina la concentración de proteína en 1 ml de conjugado (método de Bradford, 1976) y se compara la actividad enzimática de una masa fija de enzima presente en el conjugado sin diluir, con la

de la misma masa de enzima sin conjugar.

La determinación de la actividad enzimática se realiza en una microplaca, para lo cual se preparan las siguientes diluciones de conjugado y enzima: 1; 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , en tampón EIA. Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de tampón EIA en los pocillos de la placa. A continuación se añaden 50  $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones. Inmediatamente después se añade el sustrato con el cromógeno y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Pasado este tiempo, se realiza la lectura de la reacción en el lector ELISA a 450 nm. Esta reacción no se frena, puesto que el tiempo de adición del sustrato a todos los pocillos no sobrepasa los 50 segundos.

3º) Funcionamiento del conjugado en ELISA de competición. (La metodología se desarrollará más adelante).

### CONSERVACION DE LOS CONJUGADOS HORMONA-ENZIMA.

La conservación de los conjugados se realiza de dos formas:

- 1º A corto plazo: mediante la congelación de 500  $\mu\text{l}$  de conjugado en tubos Eppendorf a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ .
- 2º A largo plazo: mediante la liofilización del volumen restante. La liofilización se realizó en el Departamento de Bromatología de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

Los liofilizados se conservan en un desecador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## VI.- ESTANDARIZACION DEL ENZIMOINMUNOANALISIS ELISA DE COMPETICION.

Una vez obtenidos los anticuerpos y conjugados necesarios para desarrollar el método enzimoimmunoanalítico ELISA de competición, se procede a la prueba a punto del mismo:

- En primer lugar, se fijan las condiciones del ensayo: fase sólida (microplacas), tiempos de incubación, temperatura de realización de las distintas etapas del ensayo y tiempos de lavado y de tapizado de las microplacas.
- En segundo lugar, se determinan las diluciones de trabajo óptimas, tanto de anticuerpo como de conjugado para cada hormona esteroide.
- Por último, se construye una curva patrón para cada hormona con la ayuda de una serie de diluciones estándar de las tres hormonas.

Una vez fijados todos estos parámetros, se comienza a realizar las determinaciones hormonales en el plasma y en el líquido folicular, de los grupos de animales control y problema.

### **CONDICIONES DEL ENSAYO:**

#### **1ª Fase sólida:**

Se utilizan microplacas de poliestireno de 96 pocillos (M 29-A, Dynatech), las placas se sellan con una tapa de poliestireno (M 42-A, Dynatech) y parafilm.

### 2º Tiempos de incubación:

- a) Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas.
- b) Reacción de competición: 2 horas en oscuridad.
- c) Hidrólisis del sustrato: 1 hora en oscuridad.

### 3º Temperatura de las distintas etapas del ensayo:

- a) Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 37°C.
- b) El resto de las etapas se realizan a una temperatura de 20-22°C. Es importante que la temperatura no supere los 24°C, pues a temperaturas más elevadas, la reacción enzimática no es estable y las medidas de absorbancia experimentan grandes variaciones.

### 4º Tiempos de lavado y tapizado:

- a) Lavados: 5-10 segundos cada uno.
- b) Tapizado de las placas con la solución de conjugado: no debe superar los diez minutos, porque pasado este tiempo se observan variaciones en los valores de absorbancia de las columnas tapizadas en los últimos lugares.

**DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS Y  
CONJUGADOS EN ELISA. DETERMINACION DE LAS DILUCIONES  
DE TRABAJO OPTIMAS EN EL ENSAYO.**

Para determinar las diluciones de trabajo óptimas de los anticuerpos frente a estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona y sus respectivos conjugados, se realizan una serie de pruebas. Estas consisten en enfrentar diluciones variables tanto de antígeno como de conjugado.

Las diluciones empleadas son las siguientes:

- Para los anticuerpos: 1/1.000; 1/2.000; 1/4.000 y 1/8.000.
- Para los conjugados: 1/10.000; 1/20.000; 1/40.000 y 1/60.000.

Las diluciones se distribuyen en la placa de la siguiente manera:

**Anticuerpos:**

Columnas 1-3: 1/1.000.

Columnas 4-6: 1/2.000.

Columnas 7-9: 1/4.000.

Columnas 10-12: 1/8.000.

**Conjugados:**

Filas A-B: 1/10.000.

Filas C-D: 1/20.000.

Filas E-F: 1/40.000.

Filas G-H: 1/60.000.

Seguendo el criterio de Munro y Stabenfeldt (1984), se seleccionan aquellas diluciones que posean una densidad óptica entre 0,6 - 0,8 a 450 nm:

Progesterona: Anticuerpo: 1/4.000. Conjugado: 1/40.000.

Estradiol-17 $\beta$ : Anticuerpo: 1/2.000. Conjugado 1/20.000.

Testosterona: Anticuerpo: 1/8.000. Conjugado 1/60.000.

### TRAZADO DE LAS CURVAS ESTANDAR PARA CADA HORMONA.

Se traza una curva estándar o patrón para cada una de las tres hormonas con concentraciones conocidas. El rango de la curva estándar varía según la hormona y según el fluido biológico donde se vaya a determinar (plasma o líquido folicular), puesto que en cada caso se necesita que la técnica alcance un rango de concentración distinto.

Estas concentraciones estándar se realizan a partir de una solución madre de 2 mg/ml de progesterona, estradiol-17 $\beta$  y testosterona en etanol absoluto. Las diluciones se hacen en tubos de ensayo, de cristal, de 25 x 50 mm, con etanol absoluto, dejando que el alcohol se evapore con el fin de conseguir solubilizar las hormonas.

Cuando el etanol se evapora, las concentraciones estándar se disuelven en solución de conjugado y con ellas se realiza un ELISA de competición, para establecer las medidas de densidad óptica a 450 nm.

Con las medidas de absorbancia se trazan las curvas estándar, para cada hormona, curvas a las que se refirieren las absorbancias de las muestras problema y con las que se puede calcular la concentración de hormona esteroide presente en ellas.



El rango empleado para cada hormona es el siguiente:

• **Estradiol-17 $\beta$ :**

- plasma: 0,1 pg/pocillo - 50 pg/pocillo.
- líquido folicular: 1 pg/pocillo - 1 ng/pocillo.

• **Progesterona y testosterona:**

- tanto en plasma como en líquido folicular: 1 pg/pocillo - 1 ng/pocillo.

**REACTIVOS.**

- Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>). Merck.
- Ácido 2-[(etilmercurio)tio] benzoico, sal sódica (Thimerosal). Merck.
- Agua purificada.
- Albúmina sérica bovina, fracción V de Cohn. Sigma & Co.
- Anticuerpos anti-progesterona, anti-estradiol-17 $\beta$  y anti-testosterona: producción propia.
- Conjugados de progesterona-HRP, estradiol-17 $\beta$ -HRP y testosterona-HRP: producción propia.
- Dihidroxidrógenofosfato anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Merck.
- Etanol absoluto. Prolabo.
- Éter de petróleo 40-60°C. Panreac.
- Hormonas esteroides. Steraloids Inc.:
  - 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-ona: Testosterona.
  - 1,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol: Estradiol-17 $\beta$ .
  - 4-Pregnen-3,20-diona: Progesterona.
- Ortofenilén-diamina dihidroclorhidro (OPD): Tabletas de 10 mg. Sigma.
- Peróxido de hidrógeno: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y 110 vol.. Merck.
- Sodio Carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Merck.
- Sodio citrato di-básico 1% Hidrato (Na<sub>2</sub>HC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·1½H<sub>2</sub>O). Panreac.
- Sodio Cloruro (NaCl). Probus.
- Sodio dihidroxidrógenofosfato monohidrato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O). Merck.

- Sodio hidrógenocarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ). Merck.
- Tween-20. Merck.

## SOLUCIONES TAMPON

### 1ª SOLUCION TAMPON CARBONATO-BICARBONATO 0,05M: pH = 9,6

Para 1.000 ml de solución:

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 1,59 g.
  - $\text{NaHCO}_3$ : 2,93 g.
  - Thimerosal 1%: 5 ml
- Conservar a 4°C.

### 2ª SOLUCION TAMPON DE EIA: pH = 7,0

Para 1.000 ml de solución:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 5,421 g.
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 8,662 g.
  - $\text{NaCl}$ : 8,7 g.
  - Albúmina sérica bovina: 1,0 g.
  - Thimerosal 1%: 5 ml.
- Conservar a 4°C.

### 3ª SOLUCION TAMPON SUSTRATO: pH = 4,8

Para 1.000 ml de solución:

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ : 13 g.
  - $\text{Na}_2\text{HC}_4\text{H}_2\text{O}_5 \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ : 28 g.
  - $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, 110 vol: 1 ml
  - Thimerosal 1%: 10 ml.
- Conservar a 4°C.

## **Nº SOLUCION DE LAVADO: Solución madre (10x)**

Para 1.000 ml de solución:

- NaCl 1,5M: 87,66 g
  - Tween-20 0,5%: 5 ml
- Conservar a temperatura ambiente.

## **DESARROLLO DE LA TECNICA ELISA DE COMPETICION**

Comprende las siguientes etapas:

- 1º Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida.
- 2º Reacción de competición: adición de la muestra, o del estándar, y del conjugado.
- 3º Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos en la fase sólida.
- 4º Adición del sustrato y del cromógeno.
- 5º Lectura y procesado de los resultados.

**1º Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida:** Las microplacas se tapizan con la dilución apropiada de anticuerpo. Los anticuerpos se diluyen en agua purificada y se añaden 100 µl de esta dilución en todos los pocillos de la placa, menos en el primero que se deja como blanco.

Las placas se sellan con parafilm, se tapan y se incuban 16 horas a 37°C.

La adsorción de los anticuerpos a 37°C y su dilución en agua purificada reduce la reacción de fondo inespecífica (Coll, 1985).

Pasado el tiempo de incubación se realizan tres lavados con solución de lavado (200  $\mu$ l por pocillo). Con estos lavados se elimina el exceso de anticuerpos que no queda adsorbido a la microplaca.

Las placas se deben secar completamente antes de pasar a la siguiente etapa.

**2ª Reacción de Competición:** Esta reacción tiene lugar entre la hormona libre (estándar o problema) y la conjugada a la enzima. Tanto las muestras estándar como las problema se mezclan con la dilución de conjugado apropiada. Los conjugados se diluyen en solución tampón de ELA a 1/20.000 (estradiol-17 $\beta$ ), 1/40.000 (progesterona) y 1/60.000 (testosterona).

Las muestras estándar y problema se determinan por duplicado y se distribuyen en la placa de la siguiente forma:

**Columna 1:** La denominamos EoS; en ella solamente se añade dilución de conjugado.

**Columnas 2-4:** En ellas se añaden las distintas diluciones de las hormonas estándar diluidas en el conjugado.

**Columnas 5-11:** En ellas se añaden las muestras problema diluidas en el conjugado.

**Columna 12:** Se denomina EoE; en ella se añade dilución de conjugado.

El tapizado de las placas para la reacción de competición, se realiza añadiendo 50  $\mu$ l de tampón de ELA en todos los pocillos, después se añaden 50  $\mu$ l de los distintos reactivos siguiendo la distribución señalada.

Las placas se sellan de nuevo con parafilm, se tapan y se incuban dos horas a temperatura ambiente, en la oscuridad.

**3º Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida.** Se realiza mediante el volcado de las placas. Se efectúan cinco lavados y las placas se secan perfectamente, antes de añadir el sustrato.

**4º Adición del sustrato y del cromógeno:** El sustrato utilizado es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , 30%, 110 vol.) que se diluye en tampón sustrato, al que se le añade también el cromógeno, ortofeniléndiamina dihidroclorhidro (OPD) a una concentración de 1 mg/ml. Esta mezcla se prepara media hora antes de ser utilizada, se cierra herméticamente, para prevenir la auto-oxidación y se guarda en la oscuridad a temperatura ambiente. Se preparan 10 ml por placa.

En todos los pocillos de la placa se añaden 100  $\mu$ l de la mezcla sustrato-cromógeno. Después se vuelve a sellar con parafilm, se tapa y se deja reaccionar a temperatura ambiente y en la oscuridad, durante una hora.

**5º Lectura de las placas:** Una vez pasado el tiempo de reacción del sustrato, se procede a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado. Esta lectura se realiza en un lector automático ELISA (Eurogenetics), que es de lectura bicromática lo que elimina el color producido por una posible reacción de fondo inespecífica. Los filtros utilizados son de 450 y 600 nm.

### **ANÁLISIS HORMONAL DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE LOS GRUPOS DE ANIMALES.**

Una vez puesta a punto la técnica ELISA de Competición para la determinación de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona, se analizan las muestras de plasma y líquido folicular de los distintos grupos de animales, utilizándose un método directo sin extracción previa de la muestra, excepto en el caso del estradiol-17 $\beta$  plasmático, debido a que, al situarse las concentraciones de esta hormona, en el plasma bovino, en el rango de picogramos/ml, se produce una elevada interferencia del resto de los componentes de la muestra durante el

análisis.

#### **1º Análisis hormonal de las muestras de plasma**

El primer paso consiste en preparar la muestra para el análisis. Para ello se procede a la desnaturalización o inactivación de la proteína mediante calor, ya que el esteroide no sufre ningún tipo de alteración a la temperatura a la que se produce la desnaturalización proteica.

Las muestras de plasma, una vez descongeladas, se colocan en una gradilla y se introducen en una estufa a 60°C durante 45 minutos. Este tiempo es más que suficiente para lograr la desnaturalización de la proteína.

El estradiol-17 $\beta$  se extrae de las muestras de plasma con cinco volúmenes de dietil-éter, bajo corriente de nitrógeno, en tubos de cristal de 12 x 100 mm.

El segundo paso consiste en la dilución de las muestras de plasma en la solución de conjugado. Todas las muestras se analizan por duplicado: 100  $\mu$ l de plasma se añaden a tubos de ensayo, de cristal, de 25 x 70 mm y son disueltas en 100  $\mu$ l de conjugado y homogeneizadas cuidadosamente con la ayuda de un vórtex; con 50  $\mu$ l de esta dilución se tapizan los pocillos de la placa. Los extractos de plasma se preparan de la misma forma. El tiempo transcurrido, entre la dilución de las muestras de plasma en la solución de conjugado y el tapizado de las placas para el desarrollo de la reacción de competición, no debe ser superior a 10 minutos, debido a las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra, con la consiguiente alteración en la repetibilidad de la técnica de análisis (Zarco, 1988).

## **2º Análisis hormonal de las muestras de líquido folicular**

Las muestras de líquido folicular también sufren un proceso de preparación previo al análisis. La composición del líquido folicular es distinta a la del plasma y sus componentes (proteínas y otras sustancias de elevado peso molecular) pueden interferir en la determinación de las hormonas esteroides, al unirse inespecíficamente con el anticuerpo adsorbido en la fase sólida. Para evitar esto, se suele realizar la extracción del esteroide con éter de petróleo, pero como ya hemos indicado anteriormente este método es laborioso. La extracción se sustituye por una dilución del líquido folicular (1/100) en solución salina al 0,85%. Con esta dilución se consigue evitar la interferencia en el ensayo, de las sustancias anteriormente mencionadas.

La dilución del líquido folicular se debe efectuar con mucho cuidado, con el fin de conseguir una perfecta homogeneización de la muestra. Después se sigue la misma metodología empleada en el análisis hormonal de las muestras de plasma.

## **VII. PROCESADO DE RESULTADOS.**

### **1º PROCESADO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS HORMONAL:**

El procesado de los resultados obtenidos del análisis hormonal, de las muestras de plasma y líquido folicular, se realiza con la ayuda de un software diseñado especialmente para ello en el Departamento de Informática de la Universidad de California, Davis y consiste en:

**a) Trazado de las curvas patrón.**

Se realiza enfrentando en el eje de abscisas las concentraciones estándar de cada una de las hormonas y en el eje de ordenadas la relación  $E/E_0 \times 100$ , es decir el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo.

Estas curvas patrón sirven de referencia para el cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras problema.

**b) Cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras de plasma y líquido folicular.**

El ordenador calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas patrón. Para expresar estas concentraciones en las unidades correctas es necesario la introducción de un factor de corrección, ya que las muestras sufren distintas diluciones.

Las concentraciones de progesterona y testosterona se expresan en ng/ml tanto en plasma como en líquido folicular. Las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  se expresan en pg/ml en sangre y ng/ml en líquido folicular.

**c) Validación de la técnica.**

Se realiza mediante la determinación de los siguientes parámetros:

**Especificidad:** se estudian las reacciones cruzadas de los anticuerpos con distintos esteroides, como ya hemos detallado anteriormente.

**Precisión y repetibilidad:** se determina realizando el cálculo de los coeficientes de variación intra e inter-análisis, para lo cual se emplean concentraciones conocidas, altas, medias y bajas, de cada una de las hormonas y un número determinado de muestras problema:



- 5 pg/pocillo, 50 pg/pocillo y 500 pg/pocillo. Se realizan diez determinaciones por duplicado, de cada concentración dentro de una misma placa, repitiéndose el mismo análisis diez días consecutivos.
- Se determinan por duplicado 20 muestras problema (10 muestras de plasma y 10 muestras de líquido folicular seleccionadas al azar) en la misma placa, el mismo análisis se repite diez días consecutivos.

Exactitud: se determina calculando el porcentaje de recuperación de las muestras de concentración conocida para cada hormona.

Sensibilidad: se determina de dos formas:

- Mediante el cálculo del límite de detección: valores medios de  $E_o$ , menos 2 E.S.M., en ocho ensayos consecutivos (Abraham, 1975).
- Mediante el cálculo de la concentración de la hormona que causa el 50% de reducción del valor de unión inicial ( $E_o$ ). (Van Weemen y Schuurs, 1975).

## 2º ANALISIS ESTADISTICO:

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa BMDP: "Biomedical Data Program", en el Centro de Cálculo de Somosaguas, UCM. Se determina: Análisis de varianza, para estudiar la distribución de las variables estadísticas y test de diferencia de medias, para comprobar que los grupos de nuestro estudio y las distintas variables poseen diferencias, estadísticamente significativas, para así poder realizar el estudio de las correlaciones y el análisis de regresión.

Las variables estadísticas analizadas son:

- # Nº de animal.
- # Grupo animal.
- # Concentraciones plasmáticas de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona.
- # Parámetros ováricos: peso, longitud y anchura.
- # Situación del ovario: derecho o izquierdo.
- # Características foliculares: nº de folículos, tamaño de folículo y volumen de líquido folicular.
- # Concentraciones de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona en líquido folicular.

## **RESULTADOS**

## **1.- PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A ESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.**

El título de anticuerpos desarrollado a lo largo del período de inmunización en los seis conejos, determinado por ELISA F.I.S., se encuentra reflejado en las gráficas I-VI. Como se puede observar, todos los animales desarrollaron unos anticuerpos con unos títulos lo suficientemente elevados como para ser purificados y caracterizados, a partir de los 90 días de inmunización, alcanzando su pico máximo alrededor del 40-50 mes de inmunización. La variación individual es muy evidente, por lo que para el desarrollo del ELISA de competición se seleccionaron los anticuerpos de los conejos 1, 4 y 6. El resto después de su purificación y caracterización se liofilizó, almacenándose a -20°C.

La especificidad de los anticuerpos policlones producidos frente a las tres hormonas esteroides se puede observar en los cuadros I, II y III, donde está reflejado el porcentaje de reacciones cruzadas que presentan los tres anticuerpos utilizados para el ELISA de competición.

Las pruebas realizadas para determinar la dilución de anticuerpo óptima en el ELISA de competición dieron como resultado las siguientes diluciones:

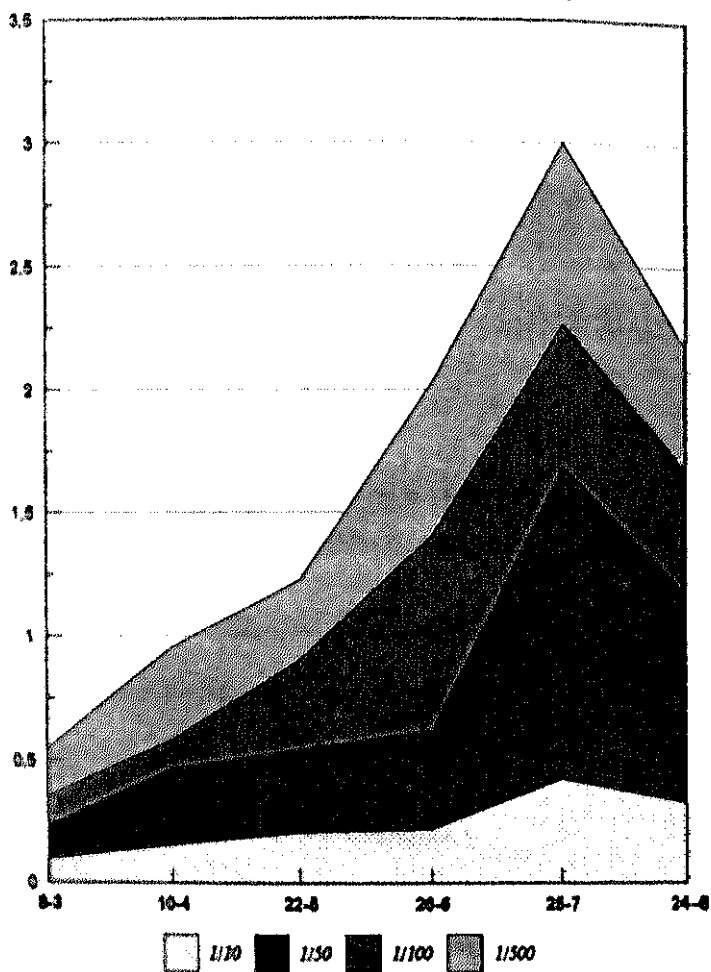
• Anti-estradiol-17 $\beta$ : 1/2.000.

• Anti-progesterona: 1/4.000.

• Anti-testosterona: 1/8.000.

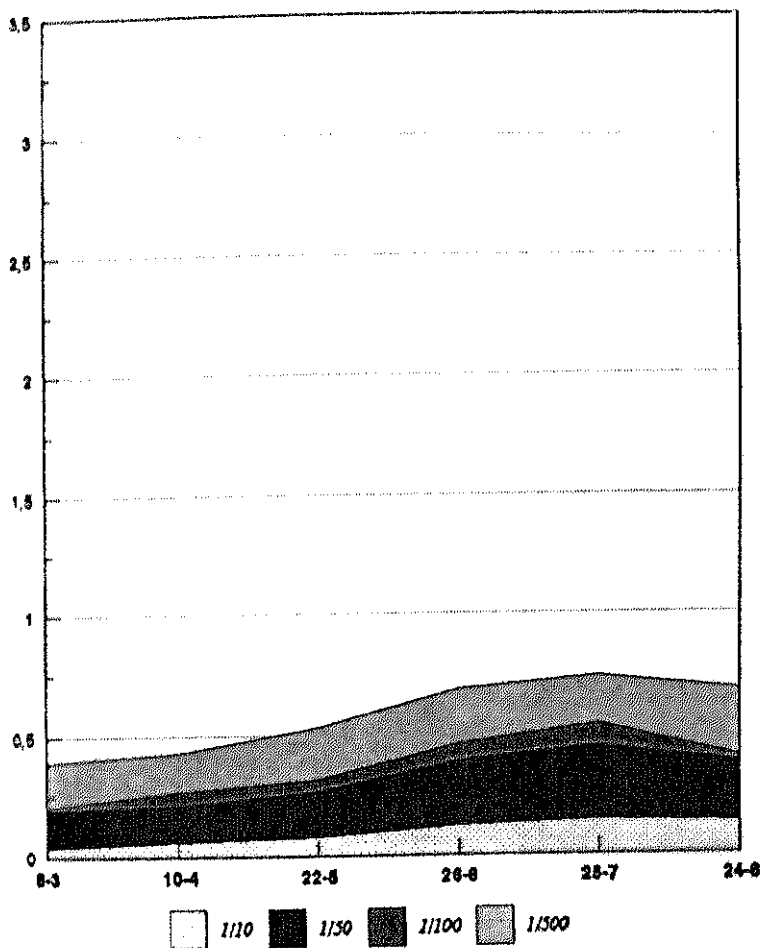
GRAFICA I.

*TITULO ANTI-E2. CONEJO 1.*



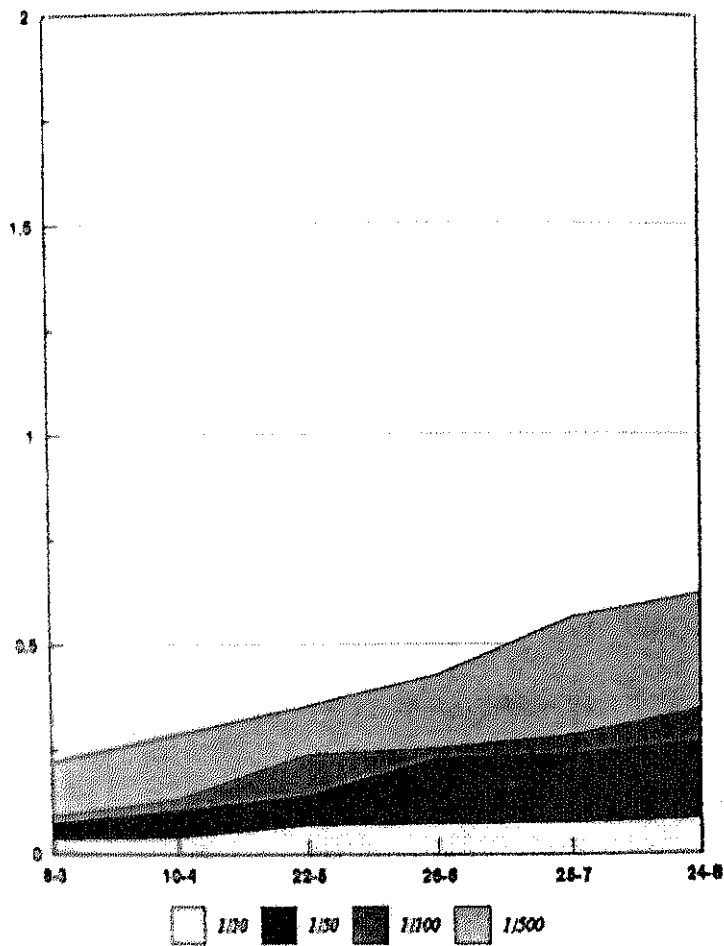
GRAFICA II.

TITULO ANTI-E2. CONEJO 2.



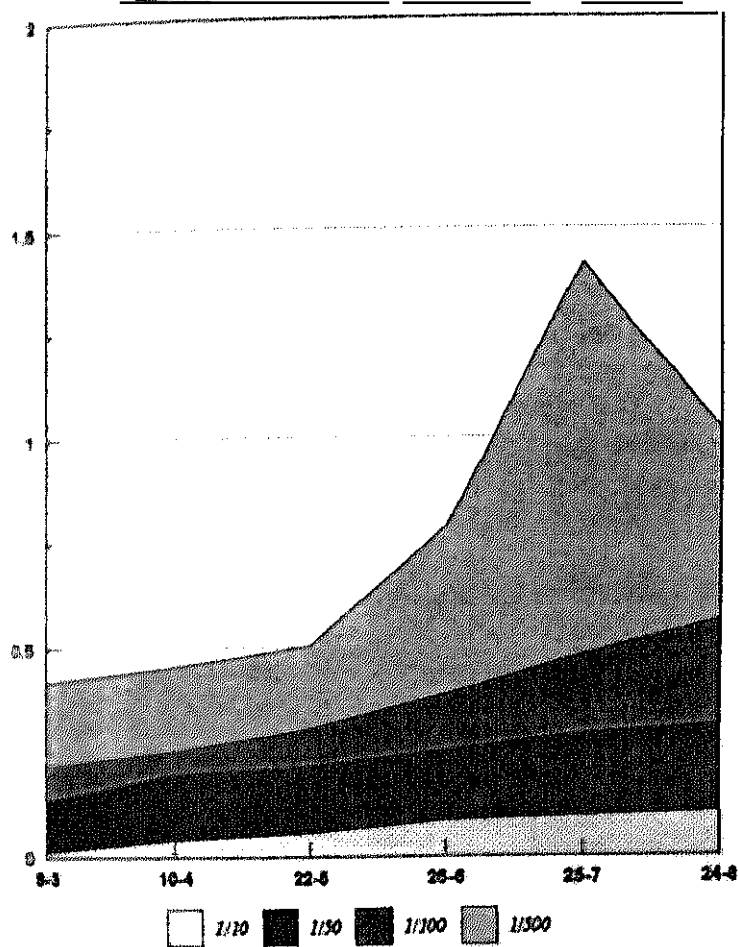
GRAFICA III.

TITULO ANTI-P4. CONEJO 3.



GRAFICA IV.

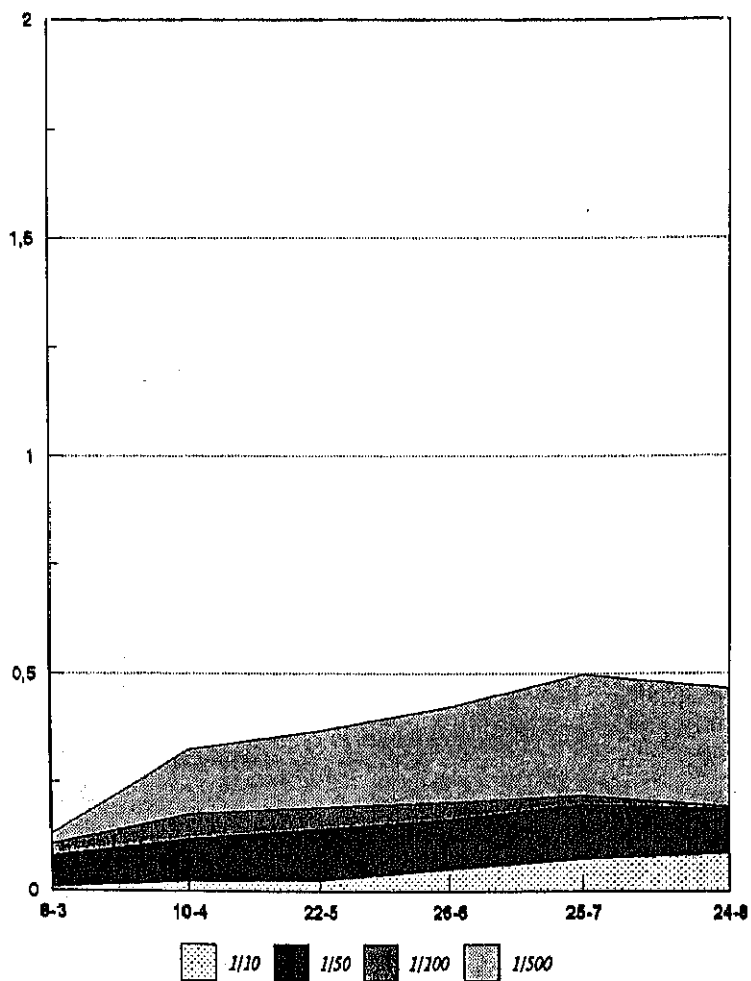
**TITULO ANTI-P4. CONEJO 4.**





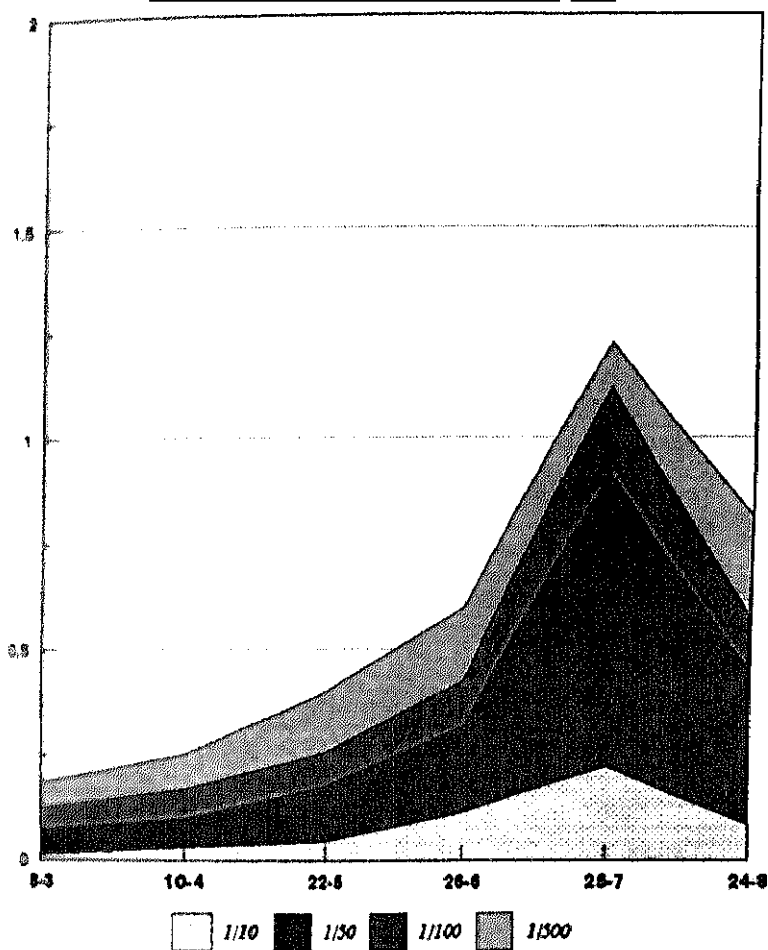
GRAFICA V.

TITULO ANTI-T. CONEJO 5.



GRAFICA VI.

*TITULO ANTI-T. CONEJO 6.*



**CUADRO 1.- REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO ANTI-E2-17 $\beta$**   
(Conejo n° 1)

ESTEROIDE	REACCION CRUZADA (%)
Estradiol-17 $\beta$	100,00
Estradiol-17 $\beta$ -6CMO	130,00
16 Ceto-Estradiol-17 $\beta$	16,70
6 Ceto-Estradiol-17 $\beta$	20,00
2 Hidroxi-Estradiol-17 $\beta$	8,74
6 $\alpha$ Hidroxi-Estradiol-17 $\beta$	12,30
Estradiol-17 $\beta$ -3 benzoato	3,28
Estradiol-17 $\alpha$	0,05
Estrona	0,50
Estriol	0,05
Progesterona	< 0,01
Testosterona	0,10
Cortisol	< 0,01

**CUADRO II.- REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO ANTI-P4**  
(Conejo nº 4)

ESTEROIDE	REACCION CRUZADA (%)
Progesterona	100,00
11 $\alpha$ -Hidroxi-Progesterona-11HS	110,00
11 $\alpha$ -Hidroxi-Progesterona	14,03
17 $\alpha$ -Hidroxi-Progesterona	<0,01
20 $\alpha$ -Hidroxi-Progesterona	<0,01
20 $\beta$ -Hidroxi-Progesterona	<0,01
Pregnendiona	21,73
Estradiol-17 $\beta$	<0,01
Estrona	<0,01
Estriol	<0,01
Testosterona	0,46
Cortisol	<0,01

CUADRO III.- REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO ANTI-T  
(Conejo nº 6)

ESTEROIDE	REACCION CRUZADA (%)
Testosterona	100,00
Testosterona-3CMO	100,00
5 $\alpha$ -Dihidro-testosterona	20,00
5 $\beta$ -Dihidro-testosterona	5,00
Androstenodiona	11,50
Androstenodiol	3,50
Androstenolona	3,21
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol	1,00
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	0,10
Epitestosterona	0,10
Estradiol-17 $\beta$	<0,01
Estrona	<0,01
Estriol	<0,01
Pregesterona	3,74
Cortisol	0,05

## **2.- CARACTERIZACION DE LOS CONJUGADOS PEROXIDASA (HRP) ESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.**

**- Determinación de la incorporación molar de las hormonas esteroideas a la enzima:** esta relación se determinó mediante el método de Habeeb (1966) y las relaciones encontradas fueron las siguientes:

**\* Conjugado estradiol-17 $\beta$ -HRP: 1,2:1.**

**\* Conjugado progesterona-HRP: 0,86:1.**

**\* Conjugado testosterona-HRP: 1,3:1.**

**- Determinación de la actividad enzimática después de la conjugación:** se determinó mediante el método de Joyce et al. (1977) y dió como resultado la recuperación de un 70%, 85% y 90% de la actividad enzimática inicial, en los conjugados de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona, respectivamente.

**- Comportamiento de los conjugados en el ELISA de competición:** este factor es crítico para una puesta a punto óptima del método. Los resultados fueron los siguientes:

**\* Conjugado HRP-estradiol-17 $\beta$ : 1/20.000.**

**\* Conjugado HRP-progesterona: 1/40.000.**

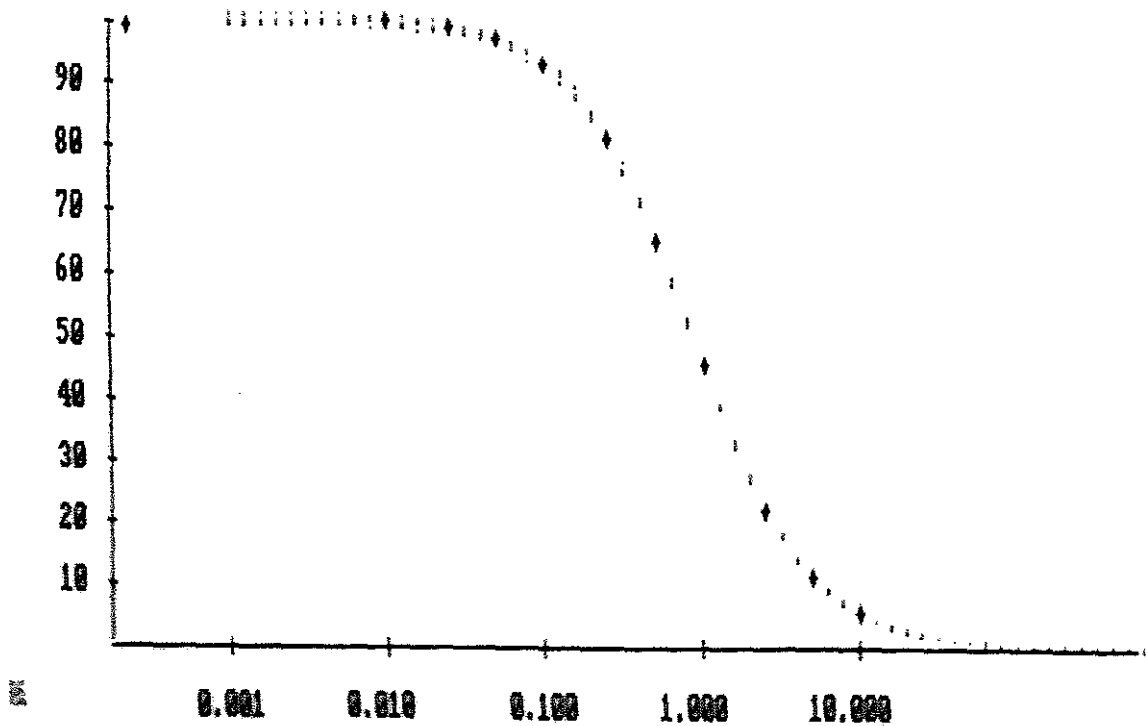
**\* Conjugado HRP-testosterona: 1/60.000.**

### 3. TRAZADO DE LAS CURVAS PATRON DE ESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

Las curvas patrón o estándar se trazaron con ayuda de un software especial (Departamento de Informática de la Universidad de Davis, USA):

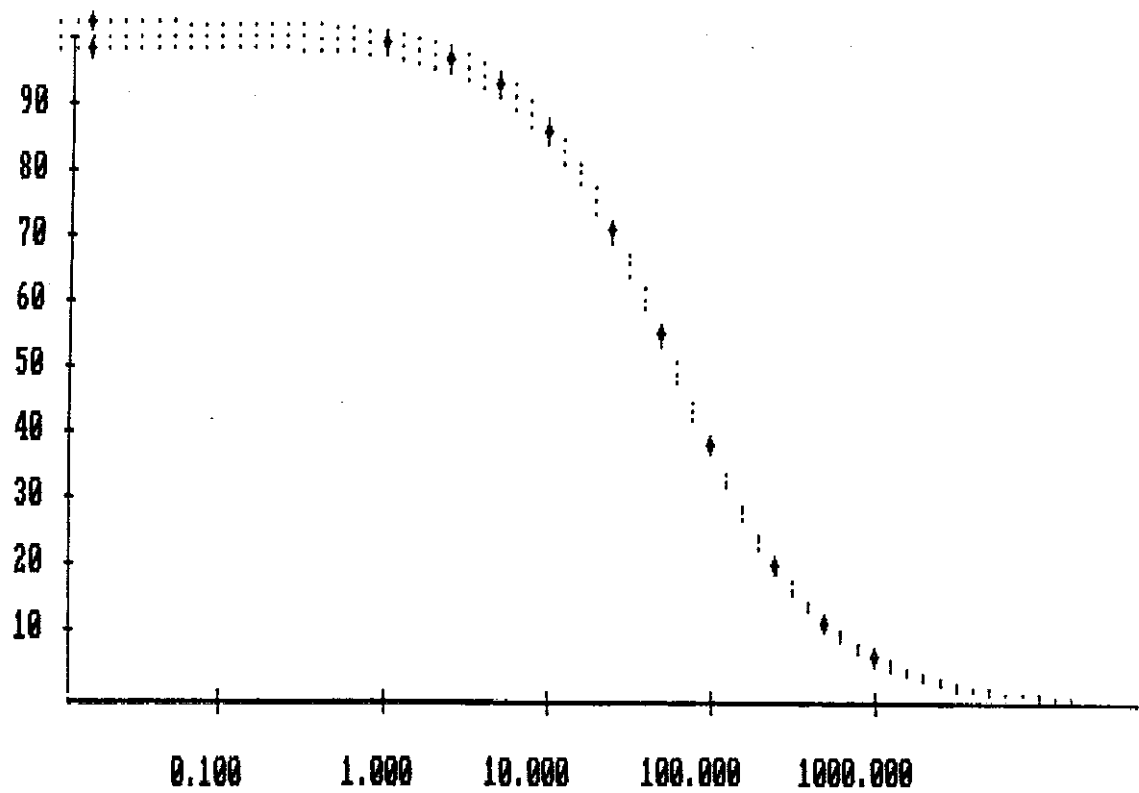
- # Curvas patrón para la analítica hormonal sanguínea: Gráficas VII, VIII y IX.
- # Curvas patrón para la analítica hormonal folicular: Gráficas X, XI y XII.
- # Curvas patrón para las reacciones cruzadas con los distintos esteroides: Gráficas XIII, XIV y XV.

GRAFICA VII.- Curva patrón de estradiol-17 $\beta$  en sangre.

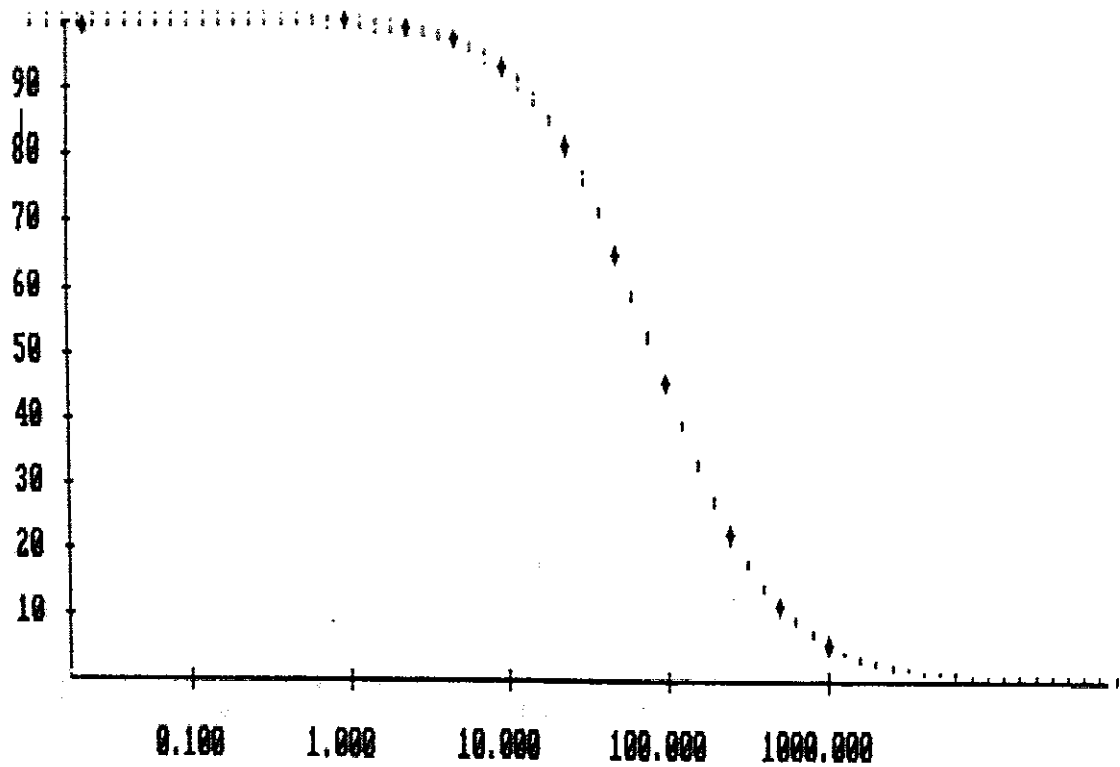




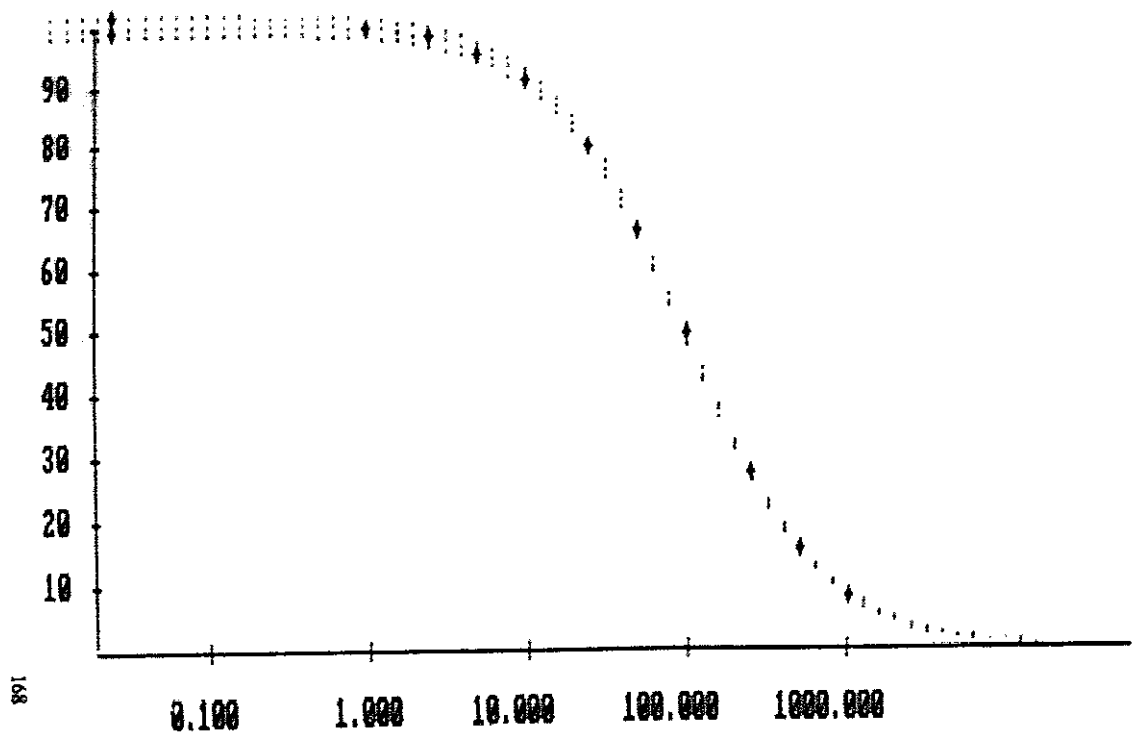
GRAFICA VIII.- Curva patrón de progesterona en sangre.



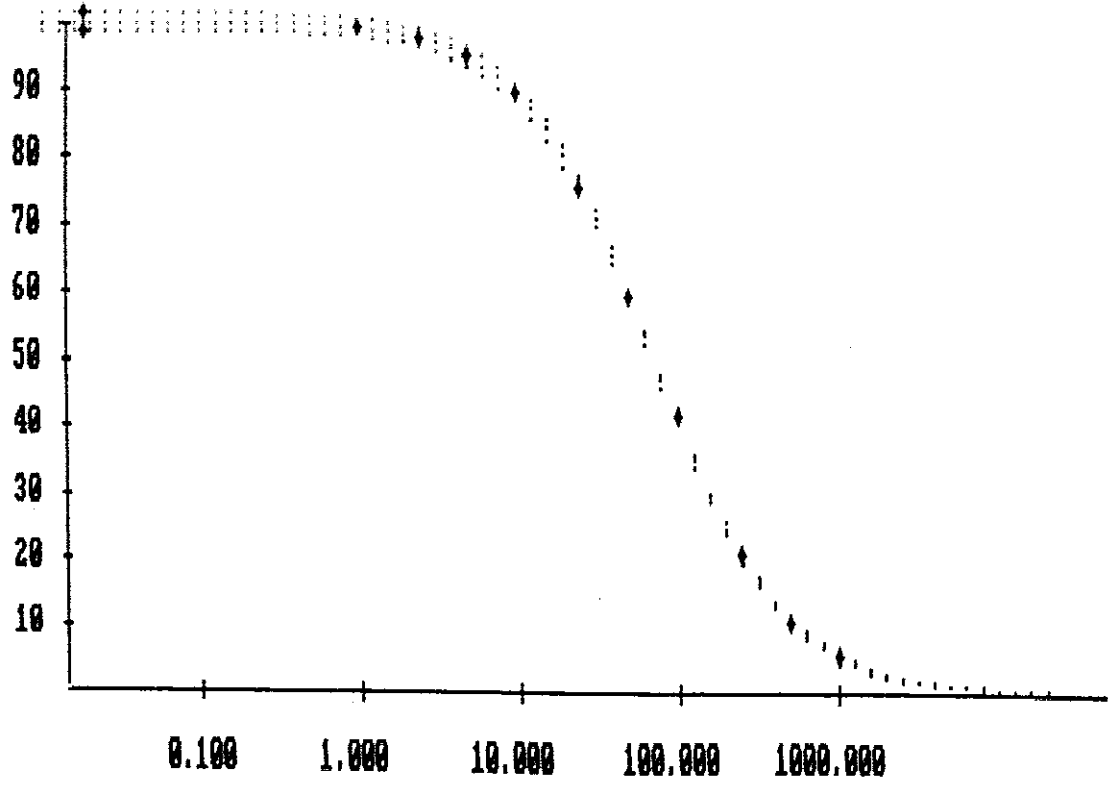
GRAFICA IX.- Curva patrón de testosterona en sangre.



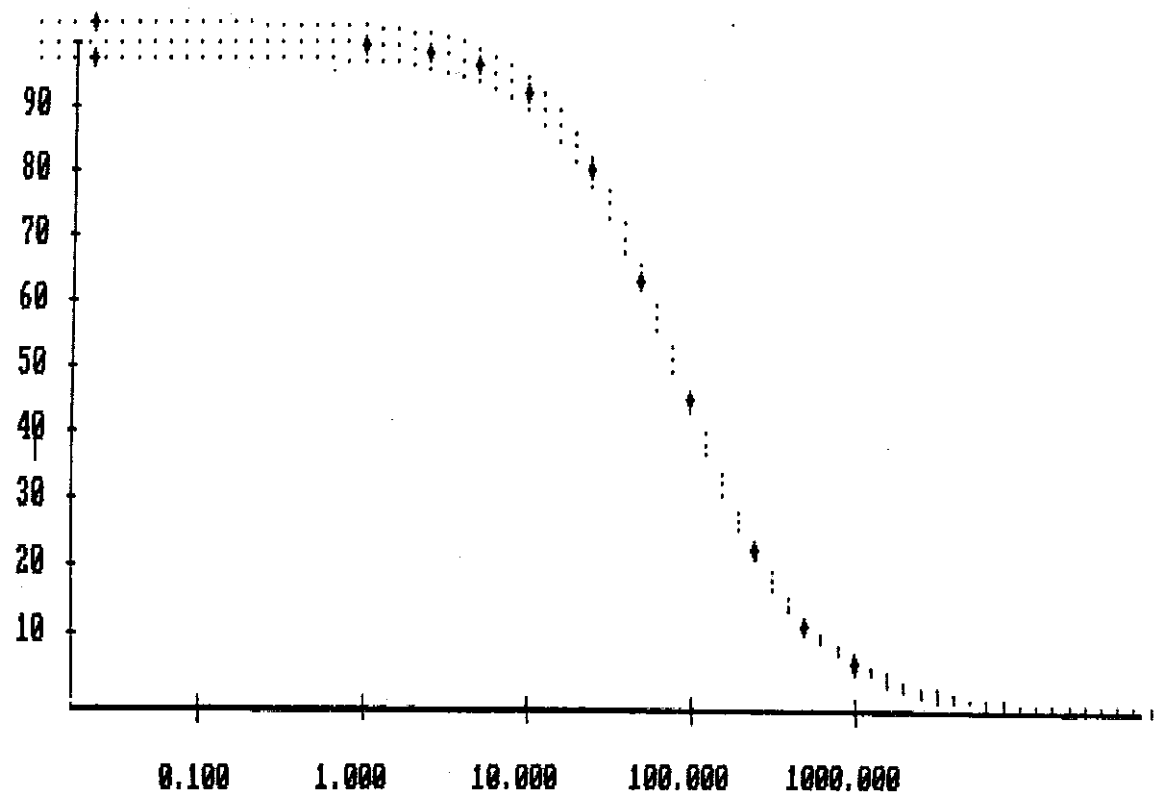
GRAFICA X. Curva patrón de estradiol-17 $\beta$  en líquido folicular.



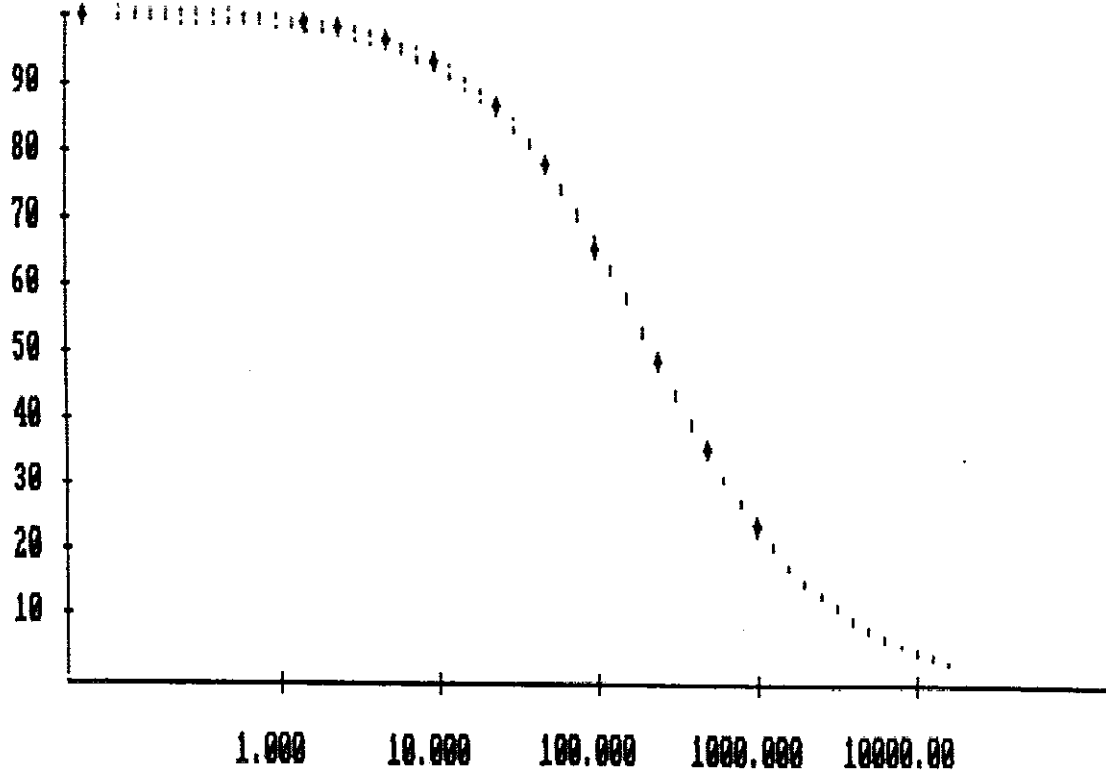
GRAFICA XI.- Curva patrón de progesterona en líquido folicular.



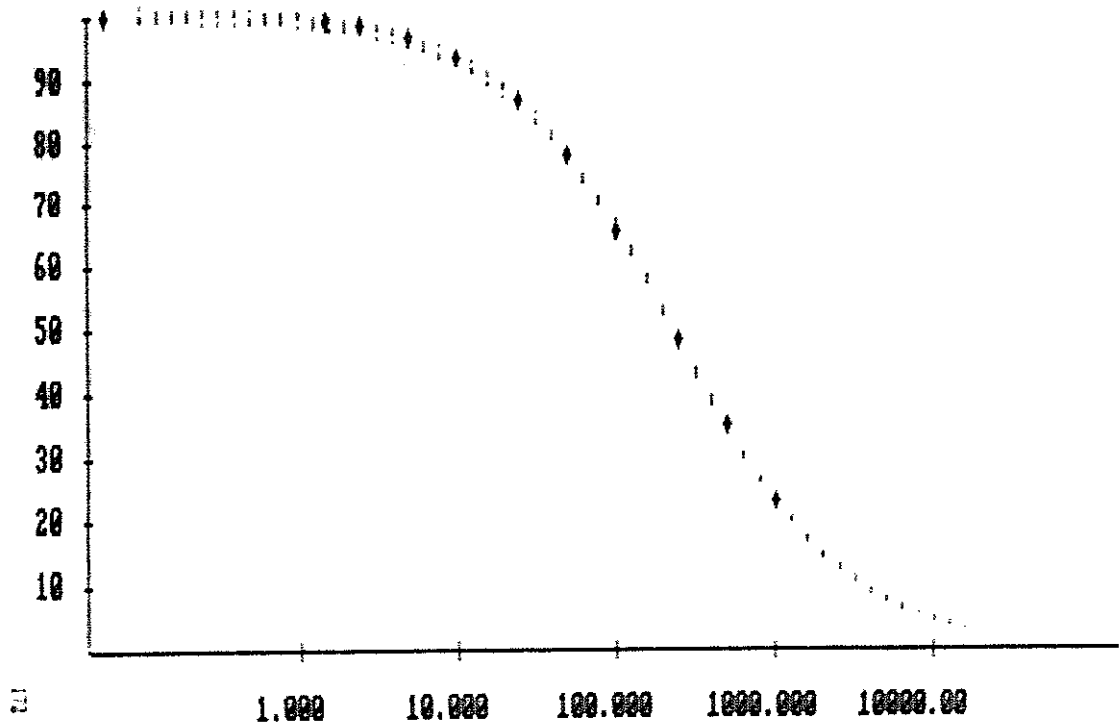
GRAFICA XII. Curva patrón de testosterona en líquido folicular.



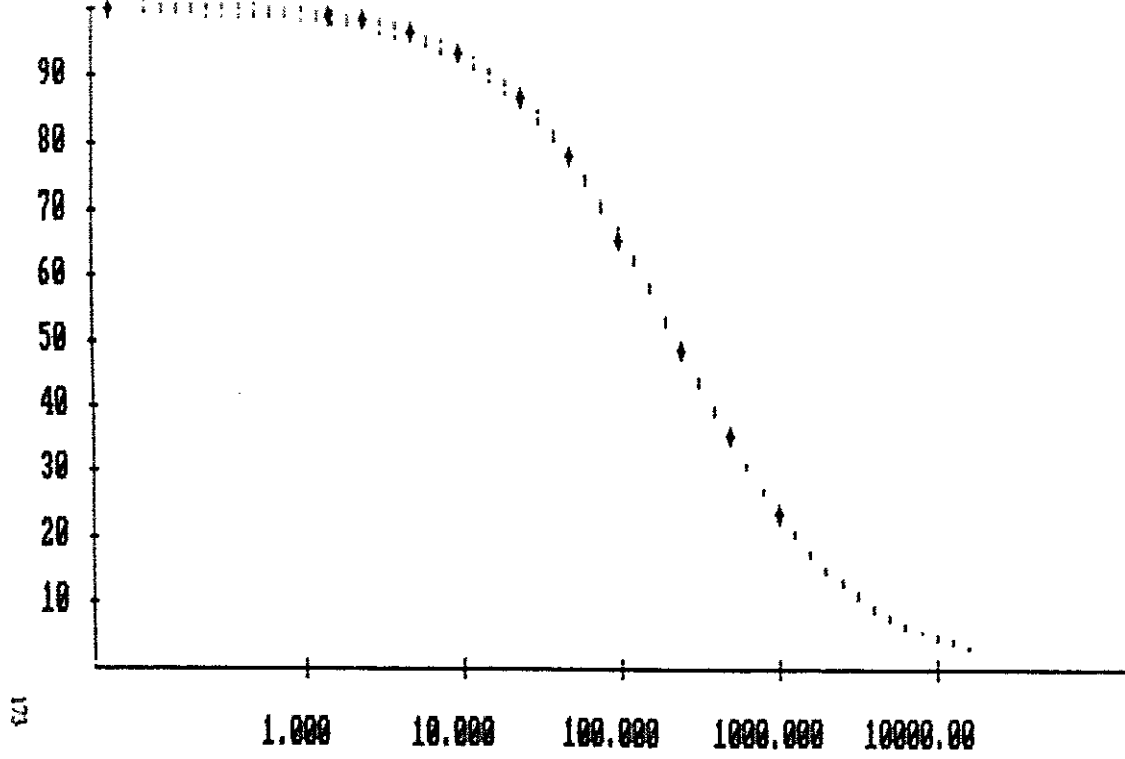
GRAFICA XIII.- Curva patrón de reacciones cruzadas de estradiol-17 $\beta$ .



GRAFICA XIV.- Curva patrón de reacciones cruzadas de progresión.



GRAFICA XV. Curva patrón de reacciones cruzadas de testosterona.





#### 4.- CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES PLASMATICAS Y FOLICULARES DE ESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

Las concentraciones plasmáticas y foliculares de cada hembra analizada se encuentran recogidas en los cuadros del anexo.

#### 5.- VALIDACIÓN DEL ELISA DE COMPETICION PARA LA DETERMINACION DE ESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

- **Precisión y repetibilidad:** se determinan mediante el calculo de los coeficientes de variación intra e inter-enayo.

$$\% \text{ C.V.} = \text{Desviación estándar/media} \times 100$$

Los coeficientes de variación de las muestras estándar y problema, determinados para cada una de las hormonas, se encuentran reflejados en los cuadros IV, V y VI.

- **Exactitud:** los porcentajes de recuperación en todos los casos analizados oscilaron entre el 85 y el 95% ( $P < 0,05$ ).
- **Sensibilidad:** se determinó de dos formas:
  - Límites de detección
  - Sensibilidad al 50% de unión.

**Cuadro IV.- Coeficientes de variación Intra e Interanálisis para ELISA  
de competición de estradiol-17 $\beta$ .**

<b>MUESTRA (n = 10)</b>	<b>C.V. INTRA-ANALISIS (%)</b>	<b>C.V. INTER-ANALISIS (%)</b>
5pg/pocillo	4,3	6,5
50pg/pocillo	3,5	4,8
500pg/pocillo	2,8	5,5
plasma	5,2	6,8
l. folicular	4,8	5,9

**Cuadro V: Coeficientes de variación intra e inter-análisis para ELISA  
de competición de progesterona.**

<b>MUESTRA (n = 10)</b>	<b>C.V. INTRA-ANALISIS (%)</b>	<b>C.V. INTER-ANALISIS (%)</b>
5pg/pocillo	4,6	5,2
50pg/pocillo	4,1	4,8
500pg/pocillo	3,2	4,0
plasma	5,1	6,2
l. folicular	4,4	5,1

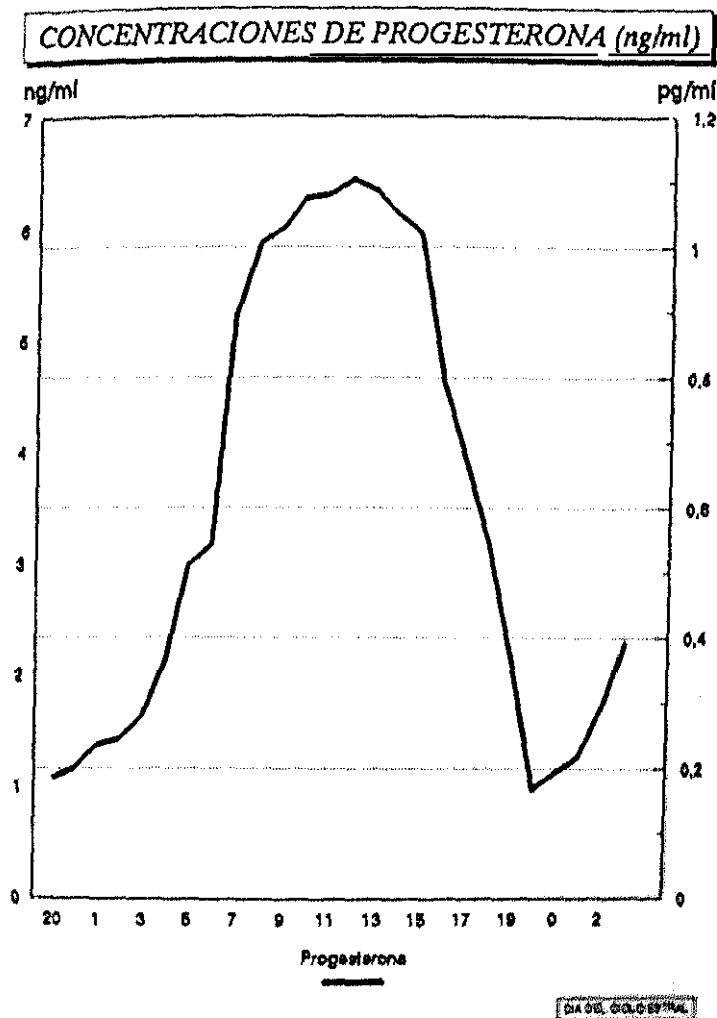
**Cuadro VI: Coeficientes de variación intra e inter-análisis para ELISA  
de competición de testosterona.**

<b>MUESTRA (n = 10)</b>	<b>C.V. INTRA-ANÁLISIS (%)</b>	<b>C.V. INTER-ANÁLISIS (%)</b>
5pg/pocillo	3,7	4,2
50pg/pocillo	2,1	4,5
500pg/pocillo	3,1	4,2
plasma	5,8	6,8
l. folicular	5,3	6,5

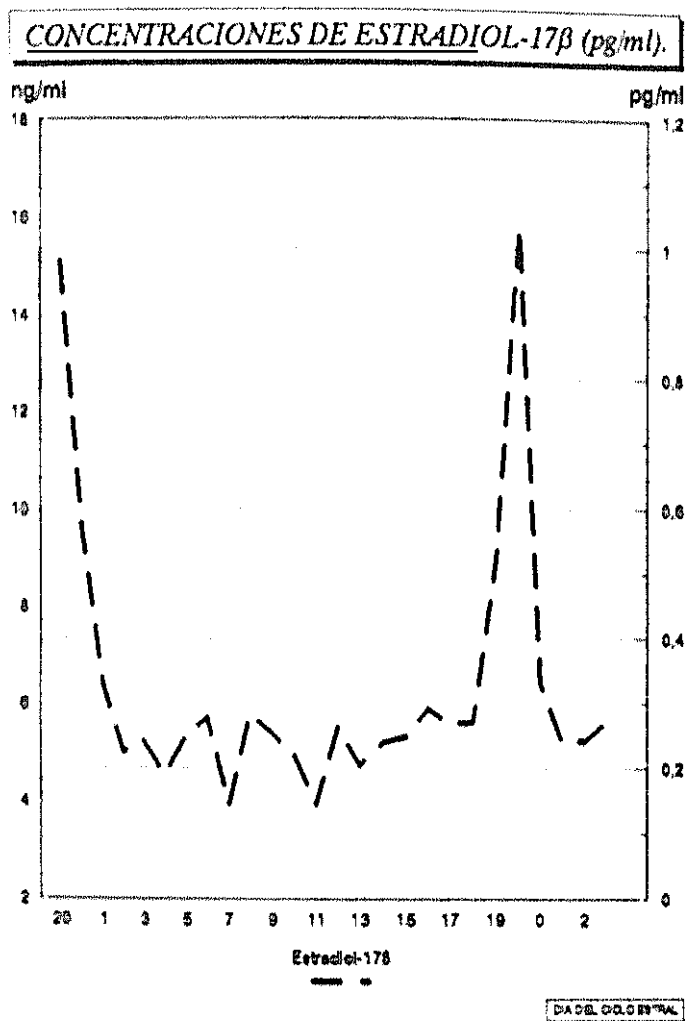
## **6.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE ESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERONA Y TESTOSTERONA A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL EN LA VACA.**

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de las tres hormonas analizadas: estradiol 17 $\beta$ , progesterona y testosterona, todos los días del ciclo estral durante dos ciclos consecutivos (n=50), con el fin de validar el método de determinación para analizar las concentraciones plasmáticas en vacas. Estas determinaciones se encuentran representadas en las Gráficas 1, 2, 3 y 4 y los valores de concentración de las tres hormonas esteroides analizadas, reflejadas en la tabla 1.

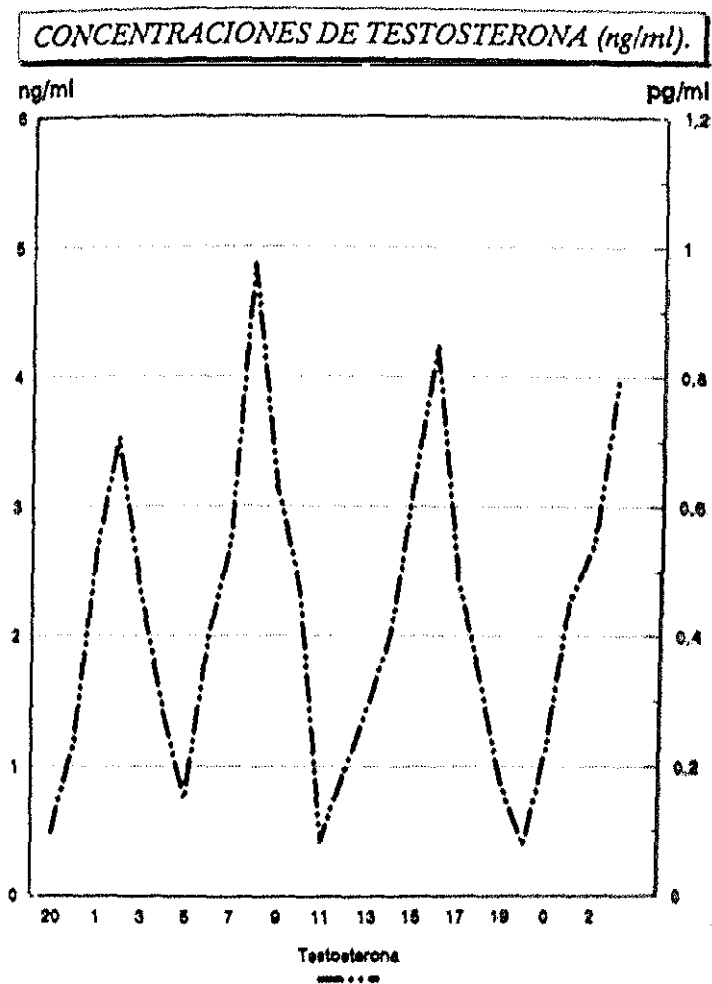
GRAFICA 1.



GRAFICA 2.



### GRAFICA 3.

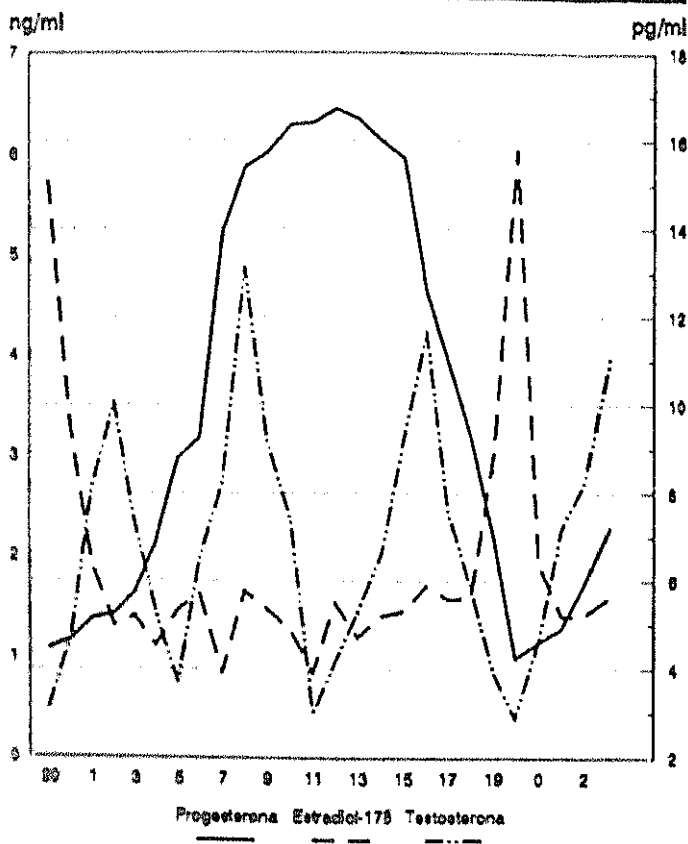


**21A DEL. C.O.D. 107-10**



GRAFICA 4.

**CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA (ng/ml),  
ESTRADIOL (pg/ml) Y TESTOSTERONA (ng/ml)  
DURANTE EL CICLO ESTRAL**



DIAS DEL CICLO ESTRAL

TABLA 1.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE PROGESTERONA,  
 ESTRADIOL-17 $\beta$  Y TESTOSTERONA DURANTE EL CICLO ESTRAL  
 (MEDIA  $\pm$  E.S.M.)

DLA	PROGESTERONA (ng/ml)	ESTRADIOL-17 $\beta$ (pg/ml)	TESTOSTERONA (ng/ml)
20	1,09 $\pm$ 0,08	15,10 $\pm$ 1,56	0,50 $\pm$ 0,18
0	1,17 $\pm$ 0,11	9,56 $\pm$ 0,36	1,18 $\pm$ 0,14
1	1,38 $\pm$ 0,09	6,39 $\pm$ 0,21	2,68 $\pm$ 0,41
2	1,43 $\pm$ 0,10	5,00 $\pm$ 0,28	3,53 $\pm$ 0,79
3	1,64 $\pm$ 0,23	5,22 $\pm$ 0,14	2,34 $\pm$ 0,30
4	2,14 $\pm$ 0,19	4,54 $\pm$ 0,13	1,44 $\pm$ 0,23
5	2,98 $\pm$ 0,27	5,37 $\pm$ 0,17	0,75 $\pm$ 0,19
6	3,18 $\pm$ 0,64	5,71 $\pm$ 0,23	1,98 $\pm$ 0,37
7	5,22 $\pm$ 0,56	3,92 $\pm$ 0,09	2,72 $\pm$ 0,64
8	5,87 $\pm$ 0,48	5,78 $\pm$ 0,11	4,87 $\pm$ 1,36
9	6,01 $\pm$ 0,71	5,39 $\pm$ 0,13	3,16 $\pm$ 0,48
10	6,28 $\pm$ 0,53	4,92 $\pm$ 0,11	2,38 $\pm$ 0,71
11	6,31 $\pm$ 0,39	3,92 $\pm$ 0,12	0,43 $\pm$ 0,23
12	6,44 $\pm$ 0,45	5,51 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,19
13	6,34 $\pm$ 0,38	4,73 $\pm$ 0,06	1,45 $\pm$ 0,45
14	6,12 $\pm$ 0,34	5,21 $\pm$ 0,13	2,01 $\pm$ 0,38
15	5,96 $\pm$ 0,40	5,32 $\pm$ 0,21	3,16 $\pm$ 0,44
16	4,64 $\pm$ 0,29	5,90 $\pm$ 0,18	4,24 $\pm$ 0,80
17	3,94 $\pm$ 0,31	5,60 $\pm$ 0,14	2,45 $\pm$ 0,39
18	3,18 $\pm$ 0,31	5,63 $\pm$ 0,18	1,68 $\pm$ 0,31
19	2,18 $\pm$ 0,23	8,95 $\pm$ 0,34	0,86 $\pm$ 0,23
20	0,99 $\pm$ 0,12	15,79 $\pm$ 0,92	0,39 $\pm$ 0,12
0	1,14 $\pm$ 0,09	6,42 $\pm$ 0,16	1,14 $\pm$ 0,19
1	1,28 $\pm$ 0,14	5,22 $\pm$ 0,13	2,28 $\pm$ 0,34
2	1,72 $\pm$ 0,11	5,24 $\pm$ 0,15	2,72 $\pm$ 0,31
3	2,28 $\pm$ 0,16	5,65 $\pm$ 0,09	3,98 $\pm$ 0,66



**TABLA 2.- MEDIA  $\pm$  E.S.M. DE LAS VARIABLES ESTADÍSTICAS  
ANALIZADAS**

PROGESAN (ng/ml):	2,51 $\pm$ 0,12
ESTRASAN (pg/ml):	14,18 $\pm$ 0,61
TESTOSAN (ng/ml):	1,81 $\pm$ 0,06
PESOOVA (g):	8,89 $\pm$ 0,19
LONGOVA (mm):	34,14 $\pm$ 0,32
ANCHUOVA (mm):	34,17 $\pm$ 0,16
NFOLICUL:	12,87 $\pm$ 0,73
VOLUMEN (ml):	0,57 $\pm$ 0,03
PROGESFO (ng/ml):	108,86 $\pm$ 5,22
ESTRAFO (pg/ml):	153,34 $\pm$ 9,69
TESTOSFO (ng/ml):	37,29 $\pm$ 1,96
(p < 0,05)	
(n = 680 casos)	

**TABLA 3.- MEDIA  $\pm$  E.S.M. DE LOS PARAMETROS OVÁRICOS  
ANALIZADOS SEGUN LA SITUACION DEL OVARIO.**

	OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO
PESOOVA (g)	10,08 $\pm$ 0,28	7,53 $\pm$ 0,23*
LONGOVA (mm)	35,56 $\pm$ 0,43	32,52 $\pm$ 0,45*
ANCHUOVA (mm)	25,55 $\pm$ 0,37	22,59 $\pm$ 0,33*
NFOLICUL	13,21 $\pm$ 1,05	12,99 $\pm$ 0,99*
VOLUMEN (ml)	0,68 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,03*
PROGESFO (ng/ml)	109,54 $\pm$ 7,22	108,11 $\pm$ 7,58*
ESTRAFO (pg/ml)	174,48 $\pm$ 15,80	130,18 $\pm$ 10,46*
TESTOSFO (ng/ml)	36,73 $\pm$ 2,92	37,90 $\pm$ 2,58*
(* p < 0,05 - * p > 0,01)		
(n = 680 casos)		

TABLA 4.- MEDIA ( $\pm$  E.S.M.) DE LAS VARIABLES ESTADÍSTICAS ANALIZADAS SEGUN EL GRUPO ANIMAL

VARIABLE	GRUPO						
	C1 (29)	C2 (36)	C3 (29)	P1 (356)	P2 (111)	P3 (134)	P4 (20)
PROGESAN	1,41 $\pm$ 0,01	4,63 $\pm$ 0,07	2,06 $\pm$ 0,27	3,06 $\pm$ 0,21	2,28 $\pm$ 0,22	1,29 $\pm$ 0,15	2,02 $\pm$ 0,48
ESTRASAN	7,53 $\pm$ 0,32	8,59 $\pm$ 0,25	15,17 $\pm$ 5,40	19,43 $\pm$ 0,99	15,56 $\pm$ 1,09	12,16 $\pm$ 1,01	25,45 $\pm$ 4,14
TESTOSAN	1,20 $\pm$ 0,01	3,77 $\pm$ 0,35	2,99 $\pm$ 0,35	1,80 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,08	1,30 $\pm$ 0,11	3,38 $\pm$ 0,60
PENOVIA	12,79 $\pm$ 0,16	9,07 $\pm$ 0,64		11,52 $\pm$ 0,34	5,20 $\pm$ 0,32	5,09 $\pm$ 0,22	1,98 $\pm$ 0,22
LONGOVA	42,07 $\pm$ 0,25	33,47 $\pm$ 0,75		38,56 $\pm$ 0,36	27,47 $\pm$ 0,49	27,96 $\pm$ 0,55	23,34 $\pm$ 0,88
ANCHUGVA	35,56 $\pm$ 0,52	25,24 $\pm$ 0,76		26,66 $\pm$ 0,29	21,08 $\pm$ 0,55	19,06 $\pm$ 0,33	13,09 $\pm$ 0,84
NPHJCUL	23,83 $\pm$ 5,39	8,80 $\pm$ 2,08		9,47 $\pm$ 0,84	15,37 $\pm$ 2,04	14,67 $\pm$ 1,64	40,60 $\pm$ 3,84
VOLUMEN	0,64 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,09		0,65 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,04
PROGESPO	69,07 $\pm$ 6,65	66,08 $\pm$ 6,92		138,99 $\pm$ 9,30	99,68 $\pm$ 11,31	75,75 $\pm$ 6,45	66,87 $\pm$ 4,68
ESTRAPO	177,83 $\pm$ 26,94	132,50 $\pm$ 26,79		162,76 $\pm$ 14,82	164,70 $\pm$ 32,07	134,82 $\pm$ 15,98	99,22 $\pm$ 10,25
TESTUSPO	26,06 $\pm$ 3,41	16,31 $\pm$ 2,75		26,31 $\pm$ 3,22	35,84 $\pm$ 3,56	43,07 $\pm$ 4,24	54,81 $\pm$ 4,06

(n) = n° de animales por grupo

(p < 0,05)

TABLAS 5-15.- TEST DE DIFERENCIA DE MEDIAS DE LAS VARIABLES ESTADISTICAS ANALIZADAS SEGUN EL GRUPO ANIMAL

PROGESAN (ng/ml):

	C2	C3	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	●	●
C2		○	○	○	○	○
C3			○	●	○	●
P1				○	○	●
P2					○	●
P3						○

ESTRASAN: pg/ml

	C2	C3	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	○	○
C2		○	○	○	○	○
C3			○	●	●	●
P1				○	○	●
P2					○	●
P3						○

TESTOSAN: ng/ml

	C2	C3	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	●	○
C2		○	○	○	○	●
C3			○	○	○	●
P1				○	○	○
P2					●	○
P3						○

○  $p < 0.05$

●  $p > 0.01$

PESOOVA: g

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	○
C2		○	○	○	○
P1			○	○	○
P2				●	○
P3					○

LONGOVA: mm

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	○
C2		○	○	○	○
P1			○	○	○
P2				●	○
P3					○

ANCHUOVA: mm

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	○
C2		●	○	○	○
P1			○	○	○
P2				○	○
P3					○

○  $p < 0,05$

●  $p > 0,01$

NFOLICUL:

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	●	●	○
C2		●	○	○	○
P1			○	○	○
P2				●	○
P3					○

VOLUMEN: ml

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	●	●	●	○	○
C2		●	●	●	○
P1			●	○	○
P2				○	○
P3					○

○  $p < 0,05$       ●  $p > 0,01$

PROGESFO: ng/ml

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	●	○	○	●	●
C2		○	○	●	●
P1			○	○	○
P2				●	○
P3					●

ESTRAFO: ng/ml

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	●	●	●	●	○
C2		●	●	●	○
P1			●	●	○
P2				●	○
P3					○

TESTOSFO: ng/ml

	C2	P1	P2	P3	P4
C1	○	○	○	○	○
C2		○	○	○	○
P1			●	●	○
P2				●	○
P3					○

○  $p < 0,05$     ●  $p > 0,01$

C1(n)=29; C2(n)=30; C3 (n)=10; P1(n)=356; P2(n)=111; P3(n)=134; P4(n)=20



TABLA 16.- MEDIA ( $\pm$  E.S.M.) DE LAS VARIABLES ESTADÍSTICAS ANALIZADAS SEGUN EL TAMAÑO DE FOLICULO.

VARIABLE	TAMAÑO DE FOLICULO					
	T1 (58)	T2 (54)	T3 (552)	T4 (560)	T5 (84)	T6 (4)
PROGRESAN	2,81 $\pm$ 0,69	3,07 $\pm$ 0,55	2,31 $\pm$ 0,41	2,81 $\pm$ 0,42	1,63 $\pm$ 0,56	0,97 $\pm$ 0,71
EXTRASAN	11,99 $\pm$ 5,27	9,83 $\pm$ 4,95	12,40 $\pm$ 2,06	14,54 $\pm$ 2,14	18,43 $\pm$ 2,67	12,59 $\pm$ 2,73
TESTOSAN	2,37 $\pm$ 0,68	2,11 $\pm$ 0,47	1,92 $\pm$ 0,37	1,69 $\pm$ 0,35	2,44 $\pm$ 0,29	0,81 $\pm$ 0,25
PESO OVA	7,50 $\pm$ 1,65	6,42 $\pm$ 1,18	7,98 $\pm$ 1,43	8,07 $\pm$ 1,23	9,56 $\pm$ 0,90	20,45 $\pm$ 4,24
LONGOVA	33,19 $\pm$ 3,43	31,06 $\pm$ 1,62	32,84 $\pm$ 2,17	32,10 $\pm$ 1,72	34,25 $\pm$ 1,29	40,35 $\pm$ 2,50
ANCHUOVA	24,52 $\pm$ 3,41	20,28 $\pm$ 1,78	23,02 $\pm$ 2,30	24,18 $\pm$ 1,85	24,80 $\pm$ 1,01	33,18 $\pm$ 1,77
NFOLICUL.	39,43 $\pm$ 4,78	17,12 $\pm$ 1,87	37,23 $\pm$ 3,76	1,94 $\pm$ 0,88	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
VOLUMEN	0,36 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,10	6,43 $\pm$ 2,63
PROGESPO	75,36 $\pm$ 9,16	119,81 $\pm$ 17,29	89,01 $\pm$ 5,34	81,04 $\pm$ 16,02	63,02 $\pm$ 13,86	518,40 $\pm$ 38,11
ENTRAPO	97,42 $\pm$ 8,94	98,86 $\pm$ 14,39	90,30 $\pm$ 5,02	125,82 $\pm$ 26,40	390,36 $\pm$ 40,73	49,84 $\pm$ 43,64
TESTOSPO	68,68 $\pm$ 10,35	60,18 $\pm$ 9,96	54,57 $\pm$ 5,20	17,74 $\pm$ 1,34	4,31 $\pm$ 0,20	3,02 $\pm$ 0,04

(n) = n° de casos, tamaño de foliculo  
p < 0,05

TABLA 17.- COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES ESTADISTICAS ANALIZADAS

	PROGRAMA	ESTRATAM	TESTOSAM	PROGOMA	LONGOMA	ANCHOMA	INDICACI	VOLUMEN	PROGRESO	ESTRADO	TESTOSPO
PROGRAMA		0,83***	0,51***	0,17*	0,21**	-	-	-	0,37***	-	-
ESTRATAM	0,83***		0,30***	-	-	-	-	-	0,30***	0,24***	0,16*
TESTOSAM	0,51***	0,30***		-	-	-	-	-	0,19*	0,34***	-
PROGOMA	0,17*	-	-		0,34***	0,21***	-	0,31***	0,23**	-	-
LONGOMA	0,21**	-	-	0,34***		0,30***	-	0,18*	0,19*	-	-
ANCHOMA	-	-	-	0,21***	0,30***		-	0,20**	-	-	-
INDICACI	-	-	-	-	-	-		-	-	-0,21**	0,46***
VOLUMEN	-	-	-	0,31***	0,30*	0,20**	-		0,34*	0,27***	0,30**
PROGRESO	0,37***	0,30***	0,19*	0,23**	0,19*	-	-	0,16*		-	-
ESTRADO	-	0,24***	0,34***	-	-	-	0,21**	0,27***	-		-
TESTOSPO	-	0,16*	-	-	-	-	0,46***	-0,20**	-	-	

(n = 317)

\* 60%

\*\* 70%

\*\*\* 99%

TABLAS 18-24.- CORRELACIONES ENTRE HORMONAS SANGUINEAS Y FOLICULARES  
SEGUN EL GRUPO ANIMAL

GRUPO C1	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN			0.82 ***			
ESTRASAN						
TESTOSAN	0.81 ***					
PROGESPO					-0.78 ***	0.81 ***
ESTRAPO				0.78 ***		0.87 ***
TESTOSPO				0.81 ***	-0.87 ***	

0.1 %

\* 50%

\*\* 95%

\*\*\* 99%

GRUPO C2	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN		-0.36 ***				
ESTRASAN	-0.26 ***		0.54 ***			
TESTOSAN		0.26 ***				
PROGESPO					0.61 ***	0.80 ***
ESTRAPO				-0.61 ***		0.80 ***
TESTOSPO				0.80 ***	0.60 ***	

0.1 %

\* 50%

\*\* 95%

\*\*\* 99%

GRUPO C3	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN		-0.87 ***	0.37 *			
ESTRASAN	-0.87 ***		0.79 ***			
TESTOSAN	0.37 *	0.79 ***				
PROGESPO						
ESTRAPO						
TESTOSPO						

0.1 %

\* 50%

\*\* 95%

\*\*\* 99%

GRUPO F1	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN		4,30 ***	0,37 ***	0,20 ***		
ESTRASAN	4,30 ***		0,70 ***	0,20 ***	0,27 ***	0,16 *
TESTOSAN	0,37 ***	0,70 ***		0,32 ***	0,34 ***	
PROGESPO	0,20 ***	0,20 ***	0,32 ***			
ESTRAPO		0,27 ***	0,34 ***			
TESTOSPO		0,16 *				

1,7 30

\* 50%

\*\* 50%

\*\*\* 50%

GRUPO F1	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN		4,30 ***	0,30 ***		4,30 **	4,30 **
ESTRASAN	4,30 ***		0,40 ***		0,20 **	0,40 ***
TESTOSAN	0,30 ***	0,40 ***			0,20 ***	0,10 **
PROGESPO						
ESTRAPO	4,30 **	0,20 **	0,20 ***			0,30 ***
TESTOSPO	4,30 **	0,40 ***	0,10 **		4,30 ***	

1,7 30

\* 50%

\*\* 50%

\*\*\* 50%

GRUPO F1	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN		4,70 ***			4,17 *	4,30 **
ESTRASAN	4,70 ***		0,30 ***		0,20 ***	0,20 ***
TESTOSAN		0,30 ***			0,20 *	0,20 **
PROGESPO					4,16 *	
ESTRAPO	4,17 *	0,20 ***	0,17 *	4,16 *		4,30 ***
TESTOSPO	4,30 **	0,20 ***	0,20 **		4,30 ***	

1,7 30

\* 50%

\*\* 50%

\*\*\* 50%

GRUPO F1	PROGESAN	ESTRASAN	TESTOSAN	PROGESPO	ESTRAPO	TESTOSPO
PROGESAN		0,34 ***	0,05 ***		0,40 *	
ESTRASAN	0,34 ***		0,34 ***		0,27 *	
TESTOSAN	0,05 ***	0,34 ***				4,30 **
PROGESPO						0,20 ***
ESTRAPO	0,40 *	0,27 *				
TESTOSPO			4,30 **	0,34 ***		

1,7 30

\* 50%

\*\* 50%

\*\*\* 50%

TABLA 25.- CORRELACIONES ENTRE HORMONAS SANGUINEAS Y FOLICULARES  
SEGUN EL TAMAÑO DE FOLICULO

		FOLICULOS T1	FOLICULOS T2	FOLICULOS T3	FOLICULOS T4	FOLICULOS T5	FOLICULO T6
	(n)	(39)	(28)	(126)	(180)	(88)	(3)
PROGESTAN	PROGESTANO		0.26 *	0.37 ***	0.38 ***		
	ESTRADIOLO		0.43 **	0.34 ***			0.59 ***
	TESTOSTERONO					0.40 ***	
ESTRASAN	PROGESTANO			0.30 ***	0.37 ***	0.33 ***	
	ESTRADIOLO	0.30 ***	0.46 ***	0.30 ***		0.32 ***	
	TESTOSTERONO	0.43 **	0.43 **	0.18 *	0.32 ***	0.31 *	
TESTOSTAN	PROGESTANO			0.30 ***	0.34 ***		
	ESTRADIOLO		0.50 ***	0.40 ***		0.39 ***	
	TESTOSTERONO				0.20 ***		

\* 5%

\*\*\* 99%

**TABLA 16.- PORCENTAJE DE FOLICULOS NO ATRESICOS Y ATRESICOS  
TIPO 1 (E2/P4) SEGUN EL TAMAÑO DE FOLICULO.**

TAMAÑO DE FOLICULO	% FOLICULOS NA	% FOLICULOS A
T1	79,3	20,7
T2	54,0	46,0
T3	50,0	50,0
T4	56,1	43,9
T5	25,0	25,0
T6	0,0	100,0
TOTAL	59,3	40,7

n = 504 casos.

**TABLA 27.- PORCENTAJE DE FOLICULOS NO ATRESICOS Y ATRESICOS  
TIPO 2 (E2/T) SEGUN EL TAMAÑO DE FOLICULO.**

TAMAÑO DE FOLICULO	% FOLICULOS NA	% FOLICULOS A
T1	72,1	27,6
T2	82,1	17,9
T3	76,1	23,9
T4	96,7	3,3
T5	98,9	1,1
T6	100,0	0,0
TOTAL	87,7	12,3

n = 504 casos

**TABLA 28.- PORCENTAJE DE FOLICULOS NO ATRESICOS Y ATRESICOS  
 TIPO 3 (E2/P4 + T) SEGUN EL TAMAÑO DE FOLICULO.**

TAMAÑO DE FOLICULO	% FOLICULOS NA	% FOLICULOS A
T1	24,1	75,9
T2	25,0	75,0
T3	17,6	82,4
T4	45,6	54,4
T5	72,7	27,3
T6	0,0	100,0
TOTAL	37,9	62,1

n = 304 casos.

TABLA 29.- PORCENTAJE DE FOLICULOS NO ATRESICOS Y ATRESICOS  
TIPO 1 (E2/P4) SEGUN EL GRUPO ANIMAL.

GRUPO	% FOLICULOS NA	% FOLICULOS A
C1	41,4	58,6
C2	50,0	50,0
P1	37,4	62,2
P2	59,5	40,5
P3	58,2	41,8
P4	80,0	20,0
TOTAL	44,0	56,0

n = 504 casos.

TABLA 30.- PORCENTAJE DE FOLICULOS NO ATRESICOS Y ATRESICOS  
TIPO 3 (E2/P4 + T) SEGUN EL GRUPO ANIMAL.

GRUPO	% FOLICULOS NA	% FOLICULOS A
C1	31,0	69,0
C2	26,7	73,3
P1	25,0	75,0
P2	23,4	76,6
P3	38,8	61,2
P4	35,0	65,0
TOTAL	28,1	71,9

n = 504 casos.

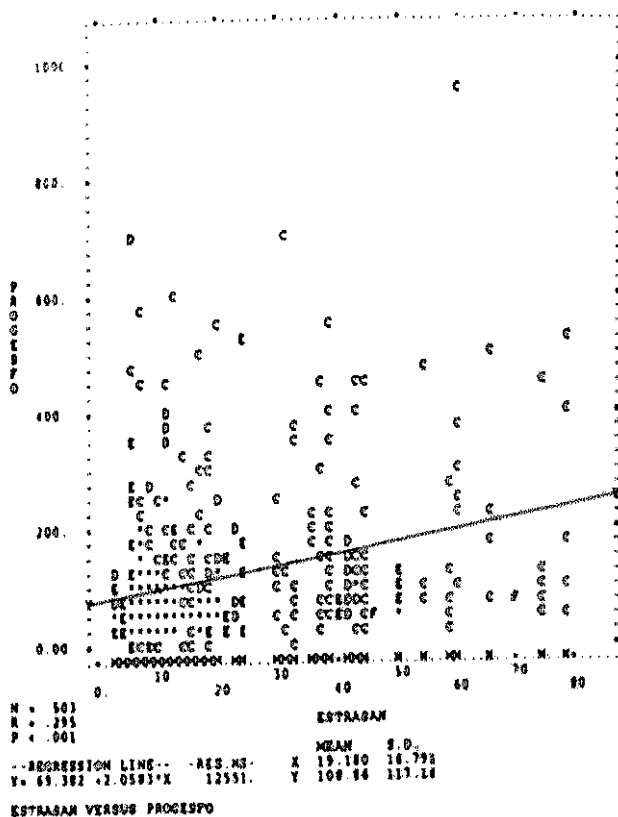


**TABLA 31.- PORCENTAJE DE FOLICULOS NO ATRESICOS Y ATRESICOS SEGUN  
LA SITUACION DEL OVARIO (DERECHO/IZQUIERDO)  
Y EL TIPO DE ATRESIA (1, 2 Y 3).**

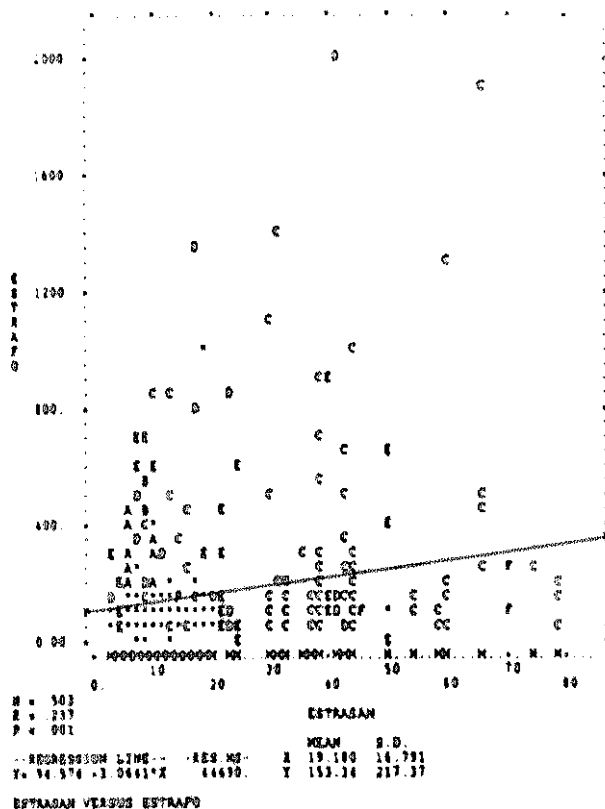
		OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO
TIPO 1	% A (n)	43,0	45,1
(E2/P4)	% NA (n)	57,0	54,9
TIPO 2	% A (n)	63,9	66,2
(E2/T)	% NA (n)	36,1	33,8
TIPO 3	% A (n)	70,0	74,1
(E2/P4+T)	% NA (n)	30,0	25,9

n = 304 casos

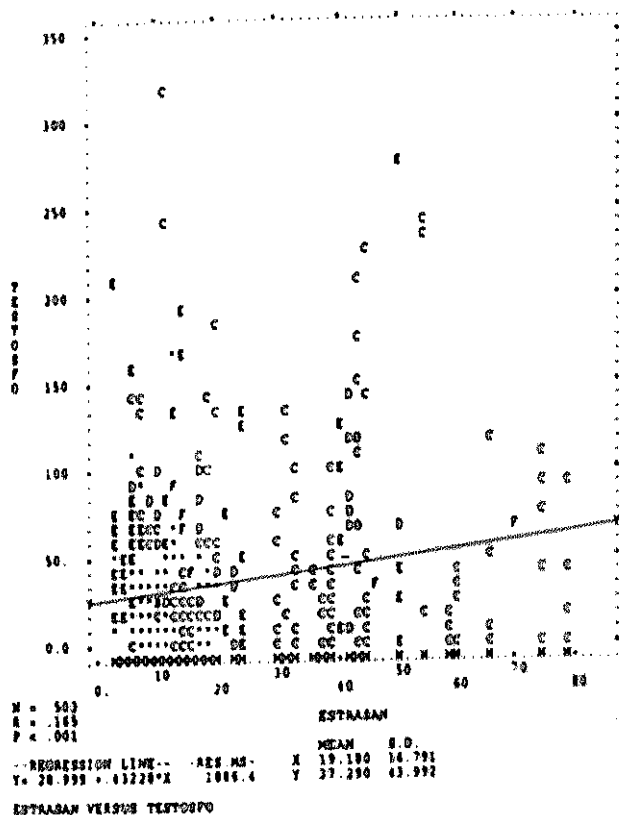
GRAFICA XVI: RECTA DE REGRESION DE ESTRADIOL-17B SANGUINEO  
SOBRE PROGESTERONA FOLICULAR



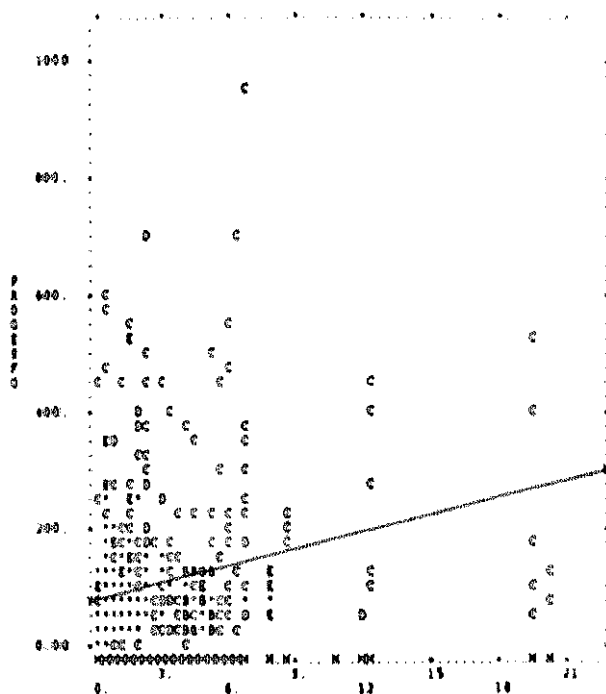
GRAFICA XVII: RECTA DE REGRESION DE ESTRADIOL-17 $\beta$  SANGUINEO  
SOBRE ESTRADIOL-17 $\beta$  FOLICULAR



GRAFICA XVIII: RECTA DE REGRESION DE ESTRADIOL-17B SANGUINEO  
SOBRE TESTOSTERONA FOLICULAR



GRAFICA XIX: RECTA DE REGRESION DE PROGESTERONA SANGUINEA  
SOBRE PROGESTERONA FOLICULAR



N = 103  
S = .248  
P < .001

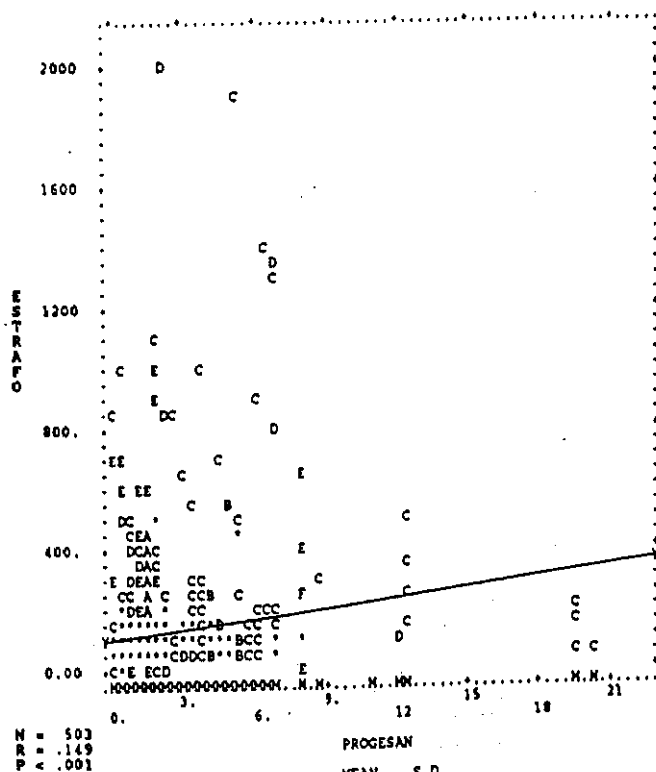
PROGESTAS

MEAN S.D.  
X 7.4002 3.0230  
Y 100.86 117.14

-- REGRESSION LINE -- RES MS --  
Y = 15.763 + 5.1236 \* X 12901.

PROGESTAS VERSUS PROGESTO

GRAFICA XX: RECTA DE REGRESION DE PROGESTERONA SANGUINEA  
SOBRE ESTRADIOL-17 $\beta$  FOLICULAR

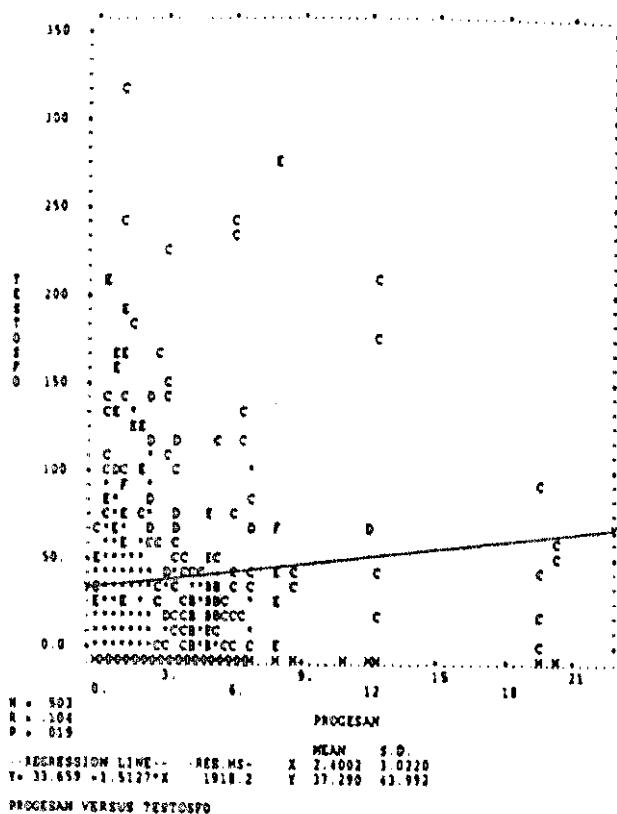


N = 503  
R = .149  
P < .001

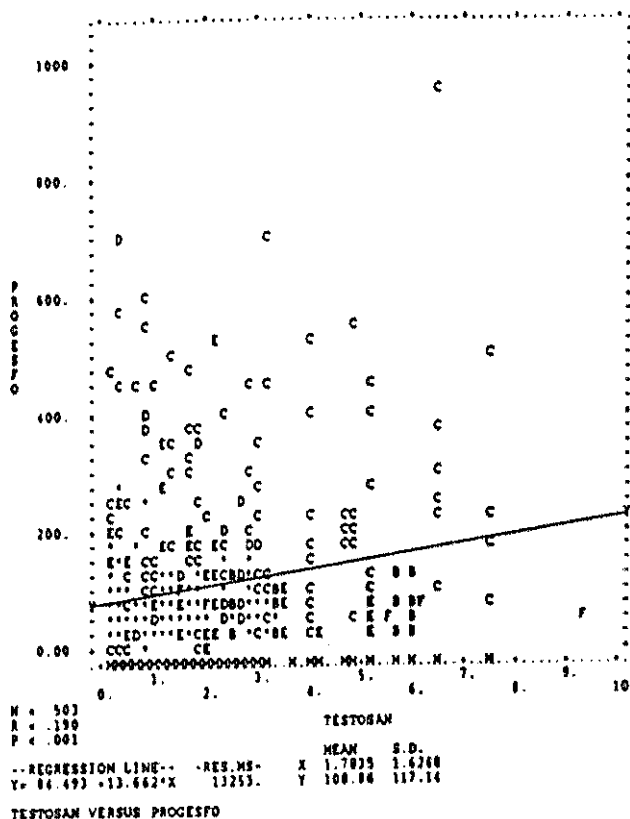
--REGRESSION LINE-- -RES.MS-  
Y = 127.58 + 10.734 \* X 46288.

PROGESAN VERSUS ESTRAFO

GRAFICA XXI: RECTA DE REGRESION DE PROGESTERONA SANGUINEA  
SOBRE TESTOSTERONA FOLICULAR

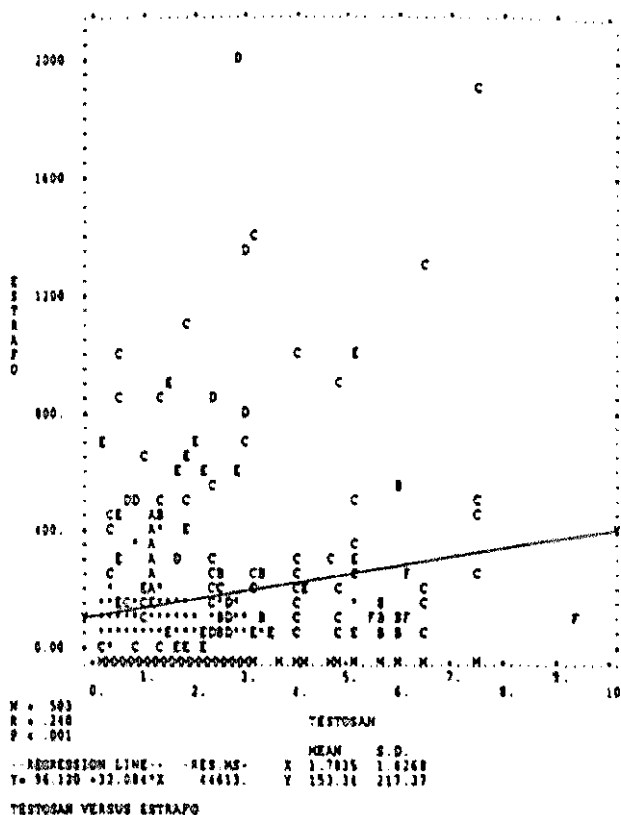


GRAFICA XXII: RECTA DE REGRESION DE TESTOSTERONA SANGUINEA  
SOBRE PROGESTERONA FOLICULAR

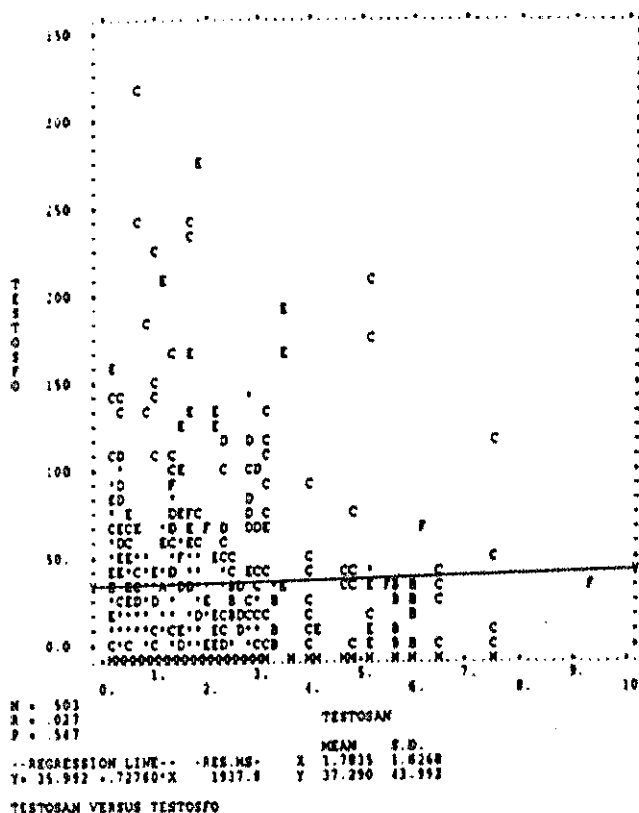




GRAFICA XXIII: RECTA DE REGRESION DE TESTOSTERONA SANGUINEA  
SOBRE ESTRADIOL-17 $\beta$  FOLICULAR



GRAFICA XXIV: RECTA DE REGRESION DE TESTOSTERONA SANGUINEA  
SOBRE TESTOSTERONA FOLICULAR



## DISCUSSION

La fisiología del ciclo reproductor de la vaca es compleja. Existe una gran cantidad de mecanismos que intervienen en la foliologénesis ovárica, la selección del folículo ovulatorio y la atresia del resto de los folículos. Hoy en día se conoce la existencia de factores intra y extraováricos, encargados de la regulación de todos los fenómenos anteriormente mencionados, aunque no todos ellos hayan sido aún determinados (Ireland, 1987; Lacker et al., 1987 a, b; Greenwald y Terranova, 1988; Tsafiri, 1988; Tonetta y diZerega, 1989). Se sabe también, que otros parámetros como la edad, la raza, alimentación, etc. (Rajakoski, 1960; Staigmiller et al., 1982; Chesworth y Easdon, 1983; Folman et al., 1983; Maurasse et al., 1985) pueden influir en la regulación o en el desencadenamiento de estos fenómenos. Sin embargo, la explicación final de todos los mecanismos citados, que culmina con la ruptura del folículo preovulatorio, no es aún bien conocida en su totalidad (Fortune et al., 1988; Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989 a, b; Driancourt, 1991; Roche y Boland, 1991).

Han sido muchos y muy variados los estudios que se han realizado en esta especie para el esclarecimiento de estos mecanismos, con un resultado muy heterogéneo. El papel que juegan las hormonas esteroideas en todos estos procesos es fundamental, por lo que un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la determinación de los momentos y mecanismos en los que intervienen estas hormonas, para lo cual se han analizado sus concentraciones en sangre periférica y/o en el líquido folicular de los folículos antrales del ovario, abarcando todos los tamaños de folículo y en las más variadas situaciones fisiológicas del ciclo reproductor de esta especie (ciclo estral, gestación, parto, período post-parto, etc.), con resultados asimismo desiguales (Rajakoski, 1960; Choudary et al., 1968; England et al., 1973; Dieleman et al., 1983; Ireland y Roche, 1983 a, b; Kruij y Dieleman, 1985; Spicer et al., 1986; Savio et al., 1990).

Sin embargo, son pocos los autores (Ireland et al., 1979; Ireland y Roche, 1982, 1983; Walters et al., 1982, 1984 a, b; McNatty et al., 1984; Wise, 1987) que han cuantificado paralelamente las concentraciones sanguíneas y foliculares de estas hormonas esteroideas, para determinar las posibles correlaciones existentes entre los

acontecimientos que se producen a estos dos niveles simultáneamente. Estos estudios son incompletos, puesto que generalmente determinan una o dos de estas hormonas a ambos niveles.

Por todo ello, nosotros hemos determinado las correlaciones existentes entre tres hormonas esteroides, pertenecientes cada una a un tipo funcional distinto (estrógenos, progestágenos y andrógenos), como las más principales que intervienen en el ciclo reproductor de la vaca: Estradiol-17 $\beta$ , Progesterona y Testosterona, con el fin de comprobar su relación con los mecanismos que se produzcan en el ovario: desarrollo y atresia de los folículos, relación tamaño del folículo y concentraciones hormonales sanguíneas y foliculares; correlación con los parámetros ováricos tales como: longitud, anchura y peso; con parámetros foliculares tales como el tamaño o diámetro de los folículos, el volumen de los mismos y el número existente (total y por tamaños) en cada ovario.

No se han incluido, en este estudio, las posibles correlaciones existentes entre la presencia del cuerpo lúteo en el ovario con los niveles foliculares y sanguíneos de las hormonas esteroides, debido a que en los días del ciclo estral en los que se encontraban las hembras seleccionadas, este cuerpo lúteo ya era funcionalmente inactivo, lo que se comprobó al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en las hembras que presentaban cuerpo lúteo, y al no existir diferencias significativas entre éstas y el resto. Tampoco se ha estudiado la influencia que el folículo dominante del ovario ejerce sobre el resto de los folículos antrales, ni sobre las concentraciones sanguíneas de las hormonas esteroides, debido a los confusos resultados aportados por los distintos autores sobre este tema (McNatty et al., 1984; Brantmeier et al., 1987; Pierson y Ginther, 1987 a, b; Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989 a, b).

El diseño de la experimentación se llevó a cabo de acuerdo con el análisis estadístico que se iba a realizar (BMDP) siguiendo las directrices del Sistema Informático de Somosaguas UCM, con el fin de poder obtener unos resultados estadísticamente manejables, para lo cual se planificó cuidadosamente la elección

de cada variable biológica. Ya se ha señalado en el capítulo de material y métodos, la forma en que se han elegido estas variables biológicas; sin embargo, nos parece importante recordar de nuevo este proceso, ya que a lo largo de este capítulo, discutiremos los criterios en los que nos hemos basado para la planificación y el desarrollo de nuestra experimentación.

Las variables biológicas utilizadas, como variables estadísticas fueron:

- 1º Grupo animal: por edades, controles y problema, procedencia.
- 2º Parámetros ováricos: longitud, anchura y peso.
- 3º Situación del ovario: lado derecho e izquierdo.
- 4º Parámetros foliculares: tamaños o diámetros, número, volumen de líquido folicular en cada categoría.
- 6º Perfiles hormonales de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona en plasma y líquido folicular .

#### Criterios de selección de la población de hembras estudiada.

La población fue seleccionada al azar, pero siguiendo unos criterios determinados.

En primer lugar, se tuvo en cuenta la edad, como un factor de influencia decisiva en los resultados de nuestro estudio, con el fin de comprobar si determina cambios significativos en la funcionalidad ovárica.

Las hembras fueron divididas en tres grupos: Termeras (de 4 a 6 meses de edad e impúberes); Novillas (de 1 a 3 años de edad) y Vacas (de 6 años en adelante). Con esta clasificación se obtuvo una muestra representativa de la

población que con más frecuencia, se encuentra en los mataderos. Los diferentes autores consultados utilizan hembras de edades similares, bien procedentes del matadero o de una explotación conocida, aunque generalmente no incluyen en el mismo estudio animales de todas las edades.

En las hembras impúberes, y por lo tanto funcionalmente inmaduras, los distintos autores han determinado los niveles de estas hormonas en sangre periférica (Swanson et al., 1972; González-Padilla et al., 1975; Schams et al., 1981; Dobson y Kamonpatana, 1986; Dodson et al., 1988; Bierley et al., 1987; Peters y Bail, 1987). En los ovarios de las hembras de este grupo de edad, obtenidos en el matadero, se observó una población de folículos antrales de pequeño tamaño, cuyos niveles hormonales en el líquido folicular no han sido estudiados, por lo que nos pareció importante incluirlas dentro de nuestro estudio.

En segundo lugar, se dispuso de una población control, de procedencia conocida, la cual no había recibido ningún tipo de tratamiento hormonal, factor determinante para los resultados de nuestra experimentación y desconocido en las hembras del matadero.

A dos de estas hembras se les analizaron los niveles sanguíneos de las tres hormonas esteroides mediante ELISA de competición, a lo largo de todos los días del ciclo estral, durante dos ciclos completos (Marcus y Durnford, 1988; Meyer et al., 1990). Con ello se consiguió un objetivo muy importante, la validación de muestras técnicas de análisis hormonal en el plasma de esta especie, puesto que los valores obtenidos coincidían con los de otros autores, tanto en la edad, como en la raza, usando RIA y EIA como técnicas de análisis (Garverick et al., 1971; Schams et al., 1977; Dobson, 1978; Wise et al., 1982; Hansel y Convey, 1983; Walters y Schallenberger, 1984 a, b; Peters, 1985; Schallenberger et al., 1985; Dobson et al., 1986; Marcus y Durnford, 1988 (EIA); Meyer et al., 1990 (EIA)).

Los resultados de estos análisis que se encuentran reflejados en las gráficas 1, 2, 3 y 4, coinciden con los de los autores señalados, lo que nos indicó que nuestra técnica era perfectamente válida para la determinación de hormonas esteroideas en el plasma sanguíneo de esta especie.

La elección de la población de hembras a analizar (control y problema) se realizó al azar, pero teniendo en cuenta la edad, como ya hemos señalado, y que estas hembras no estuviesen gestantes, lo que se comprobó mediante inspección macroscópica del aparato genital en el matadero y análisis hormonal. Las hembras que dieron positivas a la determinación de gestación fueron eliminadas de nuestro estudio. Por otro lado, el análisis hormonal durante todos los días del ciclo, nos sirvió para la clasificación de las hembras que se iban a estudiar, puesto que se intentó que todas ellas se encontrasen en el mismo estadio del ciclo estral para que los resultados obtenidos fuesen homogéneos. Nuestra clasificación está de acuerdo con los criterios de Ireland et al. (1979, 1980), Krup et al. (1983), Brammeyer et al. (1987), Spicer y Zinn, (1987) y Wise et al. (1987), relacionados con el número y aspecto de los folículos presentes en el ovario y la apariencia macroscópica del cuerpo lúteo, a lo largo del ciclo estral de la vaca. Se eligieron las hembras que se encontraban en fase lútea tardía, cuyo cuerpo lúteo no era funcionalmente activo y las que se encontraban en fase folicular.

Otros autores no tienen en cuenta este último criterio, limitándose a recoger ovarios al azar procedentes de hembras adultas, no gestantes (Henderson et al., 1982; Bushmeyer et al., 1985); sin embargo, y debido a la influencia que posee el estadio del ciclo estral sobre los fenómenos que se iban a analizar, consideramos que este tipo de elección no tiene ninguna validez, sobre todo para la determinación de la atresia folicular.

Las hembras control y problema se dividieron en tres grupos según la edad: vacas, novillas y terneras.



Desgraciadamente, no pudimos disponer de terneras control para plasma y ovarios, por lo que el estudio de las correlaciones encontradas en las hembras control y problema no se pudo realizar, en este grupo de edad, más que a nivel sanguíneo.

El grupo de novillas problema se subdividió en dos, puesto que procedían de dos mataderos distintos.

La comparación de los resultados obtenidos en las poblaciones control y problema no se encuentra reflejada en la bibliografía, dato que consideramos de suma importancia, puesto que como hemos señalado anteriormente, el control que existe en los mataderos españoles sobre el estado hormonal de los animales es muy pobre, por no decir que nulo, y los resultados obtenidos en estas hembras pueden no ser los correspondientes a su edad y estadio fisiológico, por un tratamiento inadecuado de las mismas.

#### Criterios de selección de los parámetros ováricos.

Los parámetros fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios, relacionados con las correlaciones que se iban a estudiar posteriormente y de acuerdo con la bibliografía consultada. Se midió la longitud y la anchura de todos los ovarios utilizados, clasificándolos por grupo de animal y localización (lado derecho e izquierdo) (anexo). Los distintos diámetros foliculares se determinaron tomando la media de dos o tres medidas, en la intersección de un folículo con la superficie del ovario (Ireland et al., 1982). Otros autores, que describen un estudio morfológico más detallado de los ovarios, realizan estas medidas o bien mediante secciones histológicas de los ovarios, con análisis microscópico de las diferentes capas celulares que constituyen los folículos antrales (Rajakoski, 1960; Choudary et al., 1968), o bien mediante una disección de los folículos antrales bajo un estereomicroscopio (Kruip y Dieleman, 1982). Este tipo de medidas está dirigido hacia la determinación de la atresia folicular mediante criterios morfológicos. Al no ser este nuestro objetivo, consideramos la medida externa de los diámetros

foliculares como un criterio lo suficientemente riguroso como para dividir los folículos de nuestra experimentación en varias categorías según sus tamaños o diámetros.

Los folículos antrales que hacen prominencia sobre la superficie ovárica se han clasificado básicamente en tres categorías por tamaños: pequeños, medianos y grandes. Los límites entre las tres categorías son muy variados según los autores (Kruip y Dieleman, 1982; Dieleman et al., 1983; Ireland y Roche, 1983 a, b; Bellin et al., 1984; Kruip y Dieleman, 1985; Spicer y Zinn, 1987). Otros autores clasifican los folículos antrales por su volumen, deduciendo mediante una fórmula matemática que relaciona ambos términos, el diámetro folicular (Henderson et al., 1982). Como, al final, el resultado es el mismo y este método es más complicado, al analizar un número muy grande de folículos elegimos el primero por ser más sencillo.

Nuestra intención inicial fue la de determinar los niveles hormonales en cada folículo individualmente, pero esto no fue posible debido al poco volumen de líquido folicular que poseían los folículos pequeños, por lo cual fue necesario mezclar o realizar un "pool" de líquido folicular. Este "pool" se realizó separadamente según la situación del ovario (lado derecho o izquierdo), en ningún caso se mezcló el contenido de los dos ovarios, aunque existe gran número de autores que sí lo hacen (England et al., 1973; Ireland et al., 1979; Henderson et al., 1982; Kruip y Dieleman, 1982; Dieleman et al., 1983; Bellin y Ax, 1984; Bushmeyer et al., 1985; Spicer et al., 1987). Esto, desde nuestro punto de vista, es un gran error, puesto que la funcionalidad endocrina de los dos ovarios es distinta, por lo cual, los resultados que se obtienen no se ajustan a la realidad.

La clasificación que hemos utilizado para el desarrollo de nuestra experimentación se encuentra reflejada en el material y métodos, estudiándose 6 tamaños foliculares. Puede extrañar la presencia de los folículos T3 (0.5 mm), puesto que los folículos T1 y T2 están incluidos en este tamaño. Sin embargo, esta clasificación se realizó en función de poder determinar las concentraciones

hormonales en el mayor número posible de folículos individuales en los distintos tamaños, ya que en algunos casos el volumen de líquido folicular de los folículos T2 era suficiente como para ser analizado separadamente. En otros casos, el número de folículos T1 y T2 presentes en un ovario era insuficiente para ser analizado por separado, por lo que se introdujo una tercera categoría dentro de los folículos pequeños.

Cada tamaño fue analizado estadísticamente por separado y como total de la población folicular de los distintos grupos de animales. Con estos tamaños se realizó también el estudio de la atresia folicular, mediante un criterio de clasificación endocrina, que será discutido más adelante.

Se determinaron, también, las correlaciones existentes entre niveles hormonales sanguíneos y foliculares y el volumen del líquido folicular obtenido de cada folículo o grupo de folículos, como otro factor posible de correlación.

#### Análisis hormonal de las muestras de sangre y líquido folicular.

La elección de la técnica analítica que se vaya a emplear debe realizarse con sumo cuidado puesto que de ella va a depender que los resultados de nuestro estudio sean realmente válidos y alcancen los objetivos propuestos.

Existe una gran variedad de técnicas de análisis de hormonas esteroides; sin embargo, el desarrollo de las técnicas inmunológicas, desde hace aproximadamente unas tres décadas, causó una verdadera revolución dentro del mundo de la endocrinología (Blake y Gould, 1984), por lo que su utilización para la determinación de éstas es cada vez mayor en todo el mundo, quizás debido a sus características que les confieren grandes ventajas sobre otras técnicas analíticas tradicionales.

Dentro de las técnicas inmunológicas el radioinmunoanálisis (RIA) ha sido la estrella, desde que en 1969 Abraham desarrollase su ensayo para estradiol-17 $\beta$ .

Sin embargo, esta técnica posee una serie de graves inconvenientes: la corta vida media de sus reactivos, el pequeño número de isótopos que se pueden usar en la práctica, la realización de esta técnica entraña riesgos reales sobre la salud; además, la radiación puede causar daños e incluso la destrucción de las moléculas de las hormonas marcadas; la automatización de la técnica es difícil debido a sus características, la infraestructura y el equipamiento, necesarios para desarrollar este método, son excesivamente caros, necesitándose un personal altamente cualificado y por último, el uso, distribución y eliminación del material radiactivo, está sujeto, generalmente, a unas medidas de seguridad muy estrictas y a una infraestructura de la que no todos los laboratorios pueden disponer (Schuurs y Van Weemen, 1980; Riad-Fahmy et al., 1981; Blake y Gould, 1984; Tijssen, 1985; Munro y Lasley, 1983).

Por todo ello, en las dos últimas décadas, se han desarrollado una serie de ensayos inmunológicos, no isotópicos, para la determinación de hormonas esteroides, sustituyendo los isótopos radiactivos por otras sustancias marcadoras; de tal manera, que las técnicas resultantes reúnen todas las ventajas del RIA, evitando sus grandes inconvenientes, sobre todo la utilización de la radiactividad. De entre todas ellas, los enzimo-inmunoanálisis (EIA) para esteroides que hicieron su aparición a principios de la década de los setenta (Van Weemen y Schuurs, 1972), han constituido la más clara alternativa al RIA, al poseer una serie de ventajas: sensibilidad, detectabilidad y especificidad muy elevadas. Son ensayos rápidos y simples, en los que no es necesario realizar un tratamiento previo de la muestra, o en el caso de que se realice, no es complicado. La reproducibilidad es grande y la evaluación objetiva. Es realizable bajo condiciones de campo. No existe el peligro de radiaciones. La versatilidad de los análisis puede ser significativamente incrementada, debido a la gran variedad de enzimas y a sus propiedades específicas. El coste de los reactivos es razonablemente barato y con una vida media larga. El equipamiento requerido es relativamente barato y no se necesita un personal altamente cualificado para la realización de estas técnicas (Tijssen, 1985).

A todo lo anterior hay que añadir que desde su aparición, estos métodos no sólo se han utilizado en investigación, sino que han sido enfocados hacia el

diagnóstico práctico, lo que hace que la aplicación de estas técnicas en endocrinología veterinaria sea muy interesante (Schuurs y Van Weemen, 1980).

Una vez evaluadas y comparadas las características de los métodos inmunológicos de análisis hormonal, isotópicos y no isotópicos, nos decidimos por estos últimos, puesto que eran idóneos para nuestra infraestructura, además la posibilidad de adaptarlos para pruebas de campo nos pareció de suma importancia para la endocrinología veterinaria. De entre todos ellos elegimos el ELISA de competición en microplaca (Munro y Stabenfeldt, 1984). Esta técnica ha sido empleada para la determinación de todo tipo de hormonas esteroides en diversos fluidos biológicos: plasma, suero, saliva y orina, en la mayoría de las especies domésticas y en la especie humana (Dray et al., 1975; Seeger et al., 1979; Turkes et al., 1979; Nakao et al., 1980; Riad-Fahmy et al., 1981; Sauer et al., 1981; Tallon et al., 1984; Van de Wiele et al., 1982, 1986; Sauer et al., 1989 a, b), pero no se conoce su aplicación para la determinación de estas hormonas en líquido folicular ni en especies animales, ni en humana. Por todo ello, hemos puesto a punto un ELISA de competición en microplaca para la determinación de tres hormonas esteroides: estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona, en plasma y líquido folicular bovinos.

Se eligió la microplaca como fase sólida porque presenta grandes ventajas frente a otras: el volumen de muestras a analizar era muy elevado, por lo que al introducir 25 muestras por placa, se consigue reducir el tiempo de ejecución de la experimentación; al utilizar volúmenes muy pequeños se reduce el precio de los ensayos, factor que dadas las condiciones en las que se desenvuelve la investigación en nuestro país, en ocasiones, es determinante a la hora de la planificación de un estudio experimental. Al encontrarse una de las fases del ensayo unida a la fase sólida (anticuerpo), la separación de las fracciones unida y libre es sencillísima de ejecutar, basta un simple volcado de la microplaca, seguido de uno o varios lavados. Por último la repetibilidad que se consigue en la microplaca es ligeramente superior a la conseguida con otras fases sólidas (Burrells y Dawson, 1982; Wimpy et al., 1986).

Se desarrollaron dos ensayos heterólogos y uno homólogo. En la elección de uno u otro método existe gran controversia entre los autores, defensores y detractores de uno u otro sistema, ya que los resultados obtenidos son muy similares. Algunos autores (Van Weemen y Schuurs, 1975, 1976; Abuknesha y Exley, 1978; Van de Wiel et al., 1982, 1986; Sauer et al., 1986) señalan que el uso de la heterología aumenta la sensibilidad de las técnicas de análisis, ya que al no ser reconocido antigénicamente por el anticuerpo, el enlace que une el esteroide y la enzima, la afinidad de este anticuerpo por la hormona libre y conjugada es similar, favoreciendo la reacción de competición entre ambas. Sin embargo, otros autores (Dray et al., 1975; Tateishi et al., 1977; Maurer et al., 1986; Marcus y Durnford, 1988) señalan que la sensibilidad que se consigue en un ensayo homólogo es la misma que en el heterólogo y que para disminuir la afinidad del anticuerpo por el derivado esteroide unido a la enzima, lo único que se debe hacer es aumentar la dilución del anticuerpo en el ensayo, con lo que además, con el mismo volumen de anticuerpo se pueden realizar más ensayos. Es curioso comprobar (véase cuadro resumen en la introducción) cómo en el caso de la testosterona la mayoría de los ensayos desarrollados son homólogos, en el caso del estradiol-17 $\beta$  predominan los heterólogos, aunque en los últimos años la tendencia se inclina hacia los ensayos homólogos y en el caso de la progesterona las opiniones están divididas. Como se puede deducir, el problema sigue aún sin aclarar del todo, por lo que en nuestro caso, esta elección estuvo determinada fundamentalmente por la disponibilidad de obtener derivados esteroides comercialmente, para utilizarlos como inmunógenos o en el conjugado enzimático, debido a la imposibilidad de realizar en nuestro laboratorio la síntesis de nuevos derivados esteroides, al carecer de la infraestructura necesaria para ello.

Se desarrolló un ELISA heterólogo en el caso del estradiol-17 $\beta$  y de la progesterona y un ELISA homólogo para testosterona.

Los niveles sanguíneos de estradiol-17 $\beta$  en vacuno se sitúan alrededor de 2-10 pg/ml (Meyer et al., 1990), por lo que en el caso de esta hormona y debido a

las posibles interferencias que pudieran causar otros componentes de la muestra (Blake y Gould, 1984) se realizó una extracción previa al análisis, que en el caso de las otras dos hormonas no fue necesaria, probablemente porque sus concentraciones se sitúan en el rango de ng/ml y las interferencias se eliminan mediante un simple pretratamiento con calor y una dilución 1/2 con la solución del conjugado. En leche, se suele realizar la determinación directa de progesterona, aunque algunos autores también la han realizado en plasma bovino (Sauer et al., 1982; Van de Wiel et al., 1982, 1986; Marcus y Hackett, 1986; Prakash et al., 1988); sin embargo, la determinación de testosterona la realizan con una extracción previa de la muestra (Marcus y Durnford, 1988). Después de una serie de pruebas preliminares (que no se han reflejado en el capítulo de resultados) en las que se comparó el ensayo directo con el extraído, optamos por el primero, ya que las diferencias entre ambos no eran significativas. Nuestros resultados, utilizando un ensayo homólogo y directo se corresponden con los hallados por otros autores, y entran dentro del rango aportado por ellos en hembras de esta especie, utilizando RIA (McNatty et al., 1984; Wise, 1987).

El tipo de heterología utilizada en ambos casos fue una mezcla de heterología de posición y de enlace (Van Weemen y Schuurs, 1976): para el inmunógeno se utilizaron E2-6CMO y P4-11 $\alpha$ HS y para el conjugado E2-3HS y P4-3CMO.

La producción de los anticuerpos específicos frente a las tres hormonas se realizó en conejos, al reunir esta especie las condiciones idóneas para nuestros propósitos (fácil manejo, gran resistencia a las inmunizaciones, obtención en un corto período de inmunización de un antisuero con un título muy alto de inmunoglobulinas específicas, fácilmente purificables, obtención de una cantidad suficiente de plasma para nuestra experimentación) y adaptarse perfectamente a la infraestructura de nuestro Departamento.

Los inmunógenos utilizados se eligieron teniendo en cuenta las características estructurales de las hormonas, con el fin de que la antigenicidad de

los mismos fuese la más elevada: E2-6CMO, P4-11aHS y T-3CMO y al ser combinados los anticuerpos producidos con el conjugado, el reconocimiento antigénico del enlace que une el derivado esteroide a la enzima sea débil, aumentando así la sensibilidad del método (Exley y Woodhams, 1976; Grever y Odell, 1977; Exley y Abuknesha, 1978; Franek, 1987; Tiefenauer et al., 1989). Como adyuvantes se utilizaron los de Freund y en la primera inmunización se administró intramuscularmente *Bordetella pertussis* con el fin de potenciar la respuesta inmune (Munro y Stabenfeldt, 1984; Tijssen, 1985; Catty y Raykundalia, 1988). La pauta de inmunización seguida fue similar a la que utilizan la mayoría de los autores (Cuadros resumen), mediante la técnica de Vaitukaitis (1971) o de inyecciones intradérmicas múltiples (véase dibujo 1 de la introducción).

La relación molar esteroide/proteína de todos los inmunógenos era de 25 a 30 residuos de esteroide por mol de BSA, puesto que relaciones molares esteroide-proteína inferiores a 20:1 no producen la respuesta inmune adecuada (Niswender et al., 1973). El portador utilizado fue el BSA, debido a que los conejos poseen una especial afinidad por esta proteína (Kellie et al., 1975), dando como resultado unos anticuerpos altamente específicos, aunque Wickings et al. (1977) señalan que la tiroglobulina porcina es más específica para los conejos, al obtenerse títulos más elevados. Sin embargo, sólo estos autores utilizan este portador y como conclusión de su trabajo indican que la respuesta individual de los animales es el factor que realmente influye en la obtención de títulos elevados de anticuerpos policlonales frente a esteroides. Se utilizaron los mismos lotes de inmunógenos durante toda la inmunización con el fin de disminuir, en la medida de lo posible, la variación individual de la respuesta inmune de los animales (Forest et al., 1976). Las dosis de inmunógeno administradas fueron en todas las inyecciones (inmunizaciones y boosters) de 1 mg (Munro y Stabenfeldt, 1984; Munro y Lantley, 1988), aunque en este punto es donde existe una mayor diferencia entre los autores consultados, utilizando prácticamente cada uno una dosis distinta y disminuyendo ésta en los boosters, aunque todas se sitúan dentro del rango 50 µg-4 mg. Aunque no está demostrado de forma concluyente que el sexo de los animales influya en el resultado de la inmunización, Wickings et al. (1977), utilizan machos castrados



y hembras en la inmunización frente a testosterona porque afirman que en los machos adultos sin castrar se observa un aumento elevadísimo en las concentraciones plasmáticas de testosterona libre, paralelamente al aumento del título de anticuerpos. Esta testosterona se va uniendo a los anticuerpos producidos, saturando parcialmente sus lugares de unión con lo que el título es menor. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado diferencias en el desarrollo de la inmunización de nuestros conejos machos frente a testosterona con los machos inmunizados frente a estradiol-17 $\beta$  y progesterona; en estos animales no se produce la disminución del título de anticuerpos alrededor de la séptima semana de inmunización tal y como señalan estos autores. La explicación puede deberse a que las dosis empleadas por estos autores son inferiores a las nuestras, no realizan inyecciones de recuerdo (boosters) y el período de inmunización es menor. En nuestro caso, al aumentar las dosis, realizar boosters y prolongar el tiempo de inmunización es posible que las concentraciones de testosterona plasmática libres no aumenten paralelamente con el título de anticuerpos, por lo que no se produce la saturación antes mencionada.

Se realizaron cuatro inmunizaciones con ACF cada dos semanas y cuatro boosters mensuales, los dos primeros con ACF y los últimos con AIF (Munro y Stabenfeldt, 1984). A diferencia de otros autores que sacrifican a los animales al final de la inmunización (Dawson et al., 1978) nosotros seguimos manteniéndolos y actualmente se les administra un booster cada seis meses con ACF, con el fin de mantener el título conseguido. La evolución del título de los antisueños se determinó mediante ELISA FIS. Este método se ha desarrollado en nuestro departamento, al carecer de la infraestructura necesaria para determinar el título de los anticuerpos producidos por RIA, al igual que lo realizan la mayoría de los autores (cuadros resumen de la introducción). Como se puede observar en las gráficas I-VI, esta evolución es muy similar para las tres hormonas, alcanzándose el título máximo en el cuarto-quinto mes de inmunización, disminuyendo luego ligeramente, para estabilizarse.

La ventaja del ELISA FIS frente a otros métodos, es su sencillez y rapidez

de ejecución, comprobándose un aumento del título de los anticuerpos una vez purificados y eliminada la fracción de anticuerpos anti-BSA; este aumento del título es debido a la interferencia que los componentes del plasma de conejo causan en el ensayo (existe una elevada concentración de fibrinógeno), ya que como se puede comprobar, cuanto más alta es la dilución mayor es el color producido o mayor la medida de la absorbancia. Una vez eliminados estos componentes en la purificación de los anticuerpos, se puede determinar mediante el mismo método el título real de éstos. Nosotros hemos fijado la dilución 1/500 con una medida de absorbancia de 0,5 como el límite por encima del cual se puede empezar la purificación de los anticuerpos producidos. Todos los antisueros se comenzaron a purificar a partir de los 90 días, fecha que concuerda con la de otros autores (Nambara et al., 1974; Forest et al., 1976; Exley y Abuknesha, 1978; Munro y Stabenfeldt, 1984; Munro y Lasley, 1988). La purificación se realizó mediante una precipitación con sulfato amónico saturado seguida de una diálisis exhaustiva para eliminar los iones sulfato (Garvey et al., 1977), seguida de la adsorción de los anticuerpos anti-BSA (Thornycroft, 1970; Munro y Stabenfeldt, 1984). Una diferencia importante que conviene señalar entre RIA y EIA es que en el primer método se suele utilizar el antisuero sin purificar (Abraham, 1969, 1975), mientras que en el segundo, la mayoría de los autores realizan la purificación (cuadros resumen de la introducción), más o menos compleja según los casos. Posteriormente se determinó el rendimiento de los anticuerpos en mg/ml de proteína mediante el método de Bradford (1976); este método presenta una serie de ventajas, reproducibilidad, facilidad y sencillez de ejecución, estabilidad y sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ), frente a otros métodos utilizados en la determinación de proteínas (Métodos espectrofotométricos, Lowry, Biuret, etc. [Thorne, 1978]).

La caracterización de los anticuerpos producidos se llevó a cabo mediante la determinación de la especificidad, calculando el porcentaje de reacciones cruzadas que presentaban nuestros anticuerpos, en relación a otros antígenos. Como se puede observar en los cuadros I, II y III, las reacciones cruzadas de nuestros anticuerpos son mínimas y se encuentran dentro del rango que señalan la mayoría de los autores (véanse cuadros). Estas reacciones cruzadas se analizaron

por ELISA, siguiendo el criterio aportado por Abraham (1975) para la caracterización de antisueros anti-esteroides.

La segunda caracterización de los anticuerpos fue determinar su practicabilidad en la ejecución del ELISA; con esta determinación se sustituye el cálculo de la afinidad del anticuerpo, que en el caso del ELISA es difícil de calcular, además, distintos autores (Schuurs y Van Weemen, 1980; Blake y Gould, 1984; Munro y Stabenfeldt, 1984, entre otros) señalan que realmente este factor es uno de los determinantes de la sensibilidad y repetibilidad de la técnica de determinación. Las diluciones empleadas por nosotros para el desarrollo del ELISA de competición fueron 1/2.000 para el anticuerpo frente a E2, 1/4.000 para el de P4 y 1/8.000 para el de T.

La enzima elegida fue la peroxidasa de rábano picante (tipo VI, RZ = 3) al reunir las características idóneas para el desarrollo de nuestro método: está ausente en los líquidos biológicos, posee elevada actividad específica, facilidad de conjugación a los derivados esteroides, a través de los grupos reactivos que posee en su molécula, estabilidad y actividad, bajo las condiciones en las que se desarrolla el ensayo (temperatura, pH, etc.) y, por último, posee una amplia variedad de cromógenos disponibles que desarrollan unas diferencias de color, según las concentraciones existentes en la muestra, que permiten adaptar algunas de las técnicas desarrolladas a la evaluación visual de los resultados, además de la evaluación espectrofotométrica. Por otro lado, esta enzima ha sido la más utilizada por todos los autores que han desarrollado técnicas EIA para la determinación de hormonas esteroides (véase cuadros resumen).

Los derivados esteroides utilizados en la conjugación fueron: estradiol-17 $\beta$  3HS, progesterona 3CMO y testosterona 3CMO, los dos primeros cumplían los requisitos para el desarrollo del ELISA heterólogo de enlace y posición, con el mínimo reconocimiento antigénico, por parte del anticuerpo, del lugar de conjugación, con el consiguiente aumento de la sensibilidad y con el último derivado, mediante la disminución de la dilución empleada en el ensayo homólogo,

se consiguió también aumentar la sensibilidad (Hosoda et al., 1985).

El método de conjugación utilizado fue la mezcla anhidra, mayoritariamente seguido por los distintos autores (véanse cuadros resumen) para conjugar derivados esteroideos a la peroxidasa. Con este método, se evita la co-conjugación entre las moléculas de enzima que se produce al utilizar el método de la carbodimida (Sauer et al., 1982 b; Blake y Gould, 1984) y su rendimiento, que se sitúa alrededor del 20% (Kabakoff, 1980) es más que suficiente. Además, tal y como señalan Sauer et al. (1989), la eficiencia de los otros métodos de conjugación (NHS y CDI) para la peroxidasa es pobre.

Las relaciones molares esteroide/enzima que se han utilizado inicialmente, han sido en todos los casos de 20:1, con el fin de conseguir una incorporación molar del derivado esteroide a la enzima alrededor de 1:1, que se señala como idónea para conseguir una reacción de competición en las mejores condiciones (Van Weemen y Schuur, 1975; Massey y Ferris, 1980; Munro y Stabenfeldt, 1984; Marcus y Durnford, 1986; Sauer et al., 1989 a).

Los conjugados se purificaron mediante Diálisis exhaustiva seguida de una gel-filtración en Sephadex G-25. Este método es el más utilizado para la purificación de los conjugados. El Sephadex G-25 posee unas características que hacen posible eliminar todo el derivado esteroide que no haya quedado unido a la enzima y que interferiría posteriormente en el ensayo. Algunos autores (Abukneha y Exley, 1978) realizan además una cromatografía de afinidad para eliminar la enzima que no se haya conjugado. Van Weemen y Schuur (1972, 1976), desarrollaron un método de purificación de los conjugados en el que la diálisis y gel-filtración eran seguidas de una ultracentrifugación de gradiente de densidad, con lo que la fracción conjugada quedaba perfectamente separada de las libres (esteroide y enzima). Estos dos procedimientos no son necesarios en los ensayos de fase sólida, puesto que la fracción de enzima no conjugada se elimina con un simple lavado (Munro y Stabenfeldt, 1984), y así se simplifica enormemente este proceso de purificación.

La caracterización del conjugado se llevó a cabo siguiendo las pautas marcadas por otros autores (véanse cuadros), determinándose los siguientes parámetros: incorporación molar del esteroide a la enzima, determinación de la actividad enzimática después de la conjugación y practicabilidad de los conjugados en el ELISA de competición o inmunorreactividad.

La incorporación molar del esteroide a la enzima se determinó mediante el método de Habeeb (1966), modificado por Fields (1971), ante la imposibilidad de realizar esta determinación por RIA y al ofrecer el método las garantías suficientes de ser un método correcto para conocer la incorporación molar (Tijssen, 1985), aparte de ser utilizado por un elevado número de autores (véanse cuadros). Las incorporaciones molares de nuestros tres conjugados se encuentran reflejadas en el capítulo de resultados y oscilaron entre 0,86-1,3:1, lo que como se comprobó perfectamente les confirió la inmunorreactividad adecuada.

La determinación de la actividad enzimática post-conjugación se llevó a cabo mediante el método de Joyce et al. (1977), modificado por Saver et al. (1986), dando como resultado unos porcentajes de recuperación que oscilaron entre el 70-90%, porcentajes que se sitúan dentro del rango obtenido por otros autores utilizando métodos similares (Van de Wiel et al., 1982, 1986). Con la actividad enzimática recuperada queda asegurada la estabilidad de los conjugados, siempre y cuando las condiciones de conservación sean óptimas, durante un período de tiempo prolongado.

La practicabilidad del conjugado, en el ELISA de competición, es el índice de la inmunorreactividad que posee ese conjugado. No existe un criterio uniforme entre los distintos autores sobre este punto y como se puede observar en los cuadros resumen, prácticamente cada uno utiliza una dilución distinta, siempre y cuando, al validar posteriormente el método, éste cumpla las condiciones de repetibilidad requeridas. Al igual que en el caso de los anticuerpos, podemos decir que este punto es determinante para la puesta a punto y validación del método ELISA que se esté desarrollando. Como sustrato de la enzima nosotros utilizamos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y como cromógeno OPD; esta sustancia produce una coloración que varía del amarillo al naranja, pudiendo incluso realizar una determinación visual cualitativa de los resultados. Es estable durante horas y produce un rápido desarrollo del color.

Por último, se establecieron las condiciones bajo las cuales se iba a desarrollar el ensayo. La adsorción de los anticuerpos a los pocillos de la microplaca se llevó a cabo mediante su dilución en agua purificada (pH = 7), 16 horas a 37°C (Coll, 1988). La mayoría de los autores realizan esta adsorción con una solución tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6, 16 horas a 4°C (Van de Wiel et al., 1982, 1986; Munro y Stabenfeldt, 1984; Munro y Lasley, 1988). Otros utilizan soluciones tampón de acetato de pH 4-5 (Sauer et al., 1982; Marcus y Durnford, 1986) por producir un aumento de la sensibilidad. Nosotros, después de realizar numerosas pruebas preliminares, adoptamos el método de Coll (1988), al comprobar que se reducía significativamente el color inespecífico de fondo. El volumen de anticuerpo que se adhirió a los pocillos fue de 100 µl, utilizando una dilución que correspondiese a 0,5-1 µg de proteína/100 µl (Van de Wiel et al., 1986). Con esta cantidad de proteína se consigue tapizar perfectamente la superficie de los pocillos, aumentando la repetibilidad del análisis. Algunos autores realizan un retapizado con una solución de BSA (Sauer et al., 1982; Van de Wiel et al., 1982, 1986; Marcus y Hackett, 1986); sin embargo, nosotros comprobamos que este paso disminuía la repetibilidad de nuestro ensayo (tal y como apuntaron en 1984 Blake y Gould), por lo que lo eliminamos, sustituyéndolo por la utilización de una solución tampón fosfato 0,01M con un 0,1% de BSA, en la reacción de competición, que impide la adsorción inespecífica del conjugado enzimático a los "huecos" que pudiesen haber quedado sin tapizar con la solución de anticuerpo, en los pocillos.

La reacción de competición se llevó a cabo en dos horas a una temperatura de 20 ± 3°C y en oscuridad. Hay que señalar que temperaturas superiores a 24°C producen una notable disminución de los valores de absorbancia (Zarza, 1988). Otra posibilidad que se intentó fue la señalada por Marcus y Hackett (1986) que

realizan la reacción de competición a 4°C con un aumento en el rendimiento de la misma. Nuestros resultados preliminares no concordaban con los de estos autores, por lo que optamos por la temperatura ya indicada.

El tiempo empleado en el tapizado de la placa con la solución de las muestras y el conjugado no superó, en ningún caso, los ocho minutos, con lo que las diferencias entre los valores de absorbancia de las filas Eo inicial y final se encontraban dentro de los rangos apuntados como aceptables (Munro y Stabenfeldt, 1984; Marcus y Hackett, 1986; Van de Wiel et al., 1986 y Zarco, 1988); una reducción muy grande en estos valores de absorbancia hubiese influido, de gran manera, en la repetibilidad de la técnica.

La reacción enzimática se desarrolló a temperatura ambiente y en oscuridad durante una hora, y no precisó del clásico frenado, debido a que la lectura se realizó en un lector automático que completa, la lectura de todos los pocillos de la placa en 10 segundos, por lo que la variación en la medida de absorbancia entre el primer y último pocillo de la placa no es significativa.

El último paso en la puesta a punto de la técnica ELISA de competición para las tres hormonas esteroides determinadas, fue la validación de las técnicas, es decir, la adaptación de la técnica de determinación para la muestra que se iba a analizar, plasma o líquido folicular. No existen unos criterios establecidos internacionalmente para la validación de estas técnicas de determinación hormonal; sin embargo, como se puede comprobar en los cuadros resumen, todos ellos siguen, prácticamente, los mismos:

- Especificidad de la técnica de determinación, que como ya se ha señalado anteriormente dependerá en gran medida de las características del anticuerpo, de tal forma que sea capaz de discriminar la hormona que se esté determinando, de otras que puedan estar incluidas en la muestra. La especificidad de las técnicas puestas a punto está reflejada en los cuadros I, II y III de porcentajes de reacciones cruzadas que presentan los anticuerpos producidos en nuestro laboratorio,

comprobandose que estos porcentajes se encuentran dentro de los aportados por otros autores (véanse cuadros).

- La precisión y reproducibilidad de nuestras técnicas de análisis hormonal, se determinó por el cálculo de los coeficientes de variación intra e inter-ensayo, que como se puede comprobar en los cuadros IV, V y VI no superaron en ningún caso el 7%, tanto para las muestras de plasma como de líquido folicular. La exactitud de las determinaciones en cada técnica se comprobó con la determinación de los porcentajes de recuperación de concentraciones conocidas de cada una de las hormonas, obteniendo en todos los casos una recuperación del 85 al 95%. Todo ello, está de acuerdo con los criterios aportados por los distintos autores (Joyce et al., 1977; Rajkowski et al., 1978; Sadeh et al., 1979; Gros et al., 1980; Joshi et al., 1983; Munro y Stabenfeldt, 1984; Dhar et al., 1988; Marcus y Durnford, 1988; Meyer et al., 1990).

- Para el cálculo de las concentraciones de las tres hormonas en plasma y líquido folicular se trazaron las curvas patrón o estándar correspondientes a cada una de ellas, tanto en plasma como en líquido folicular, para lo que se emplearon distintas diluciones conocidas de cada hormona, según el líquido biológico que se analice. Tampoco existe un criterio uniforme entre los autores en cuanto a el rango que debe cubrir cada técnica ELISA, por lo que cada uno deberá adaptar su curva a sus necesidades (véase cuadros resumen). Con estas curvas patrón se pudo determinar la sensibilidad y el límite de detección de cada técnica. Como se puede comprobar en los resultados (gráficas VII-XV), la sensibilidad al 50% de unión y los límites de detección varían en cada caso:

#### **Estradiol-17 $\beta$ :**

**En plasma:** el límite de detección es de 0,3 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 0,83 pg/pocillo (Gráfica VII).

**En líquido folicular:** el límite de detección es de 5,23 pg/pocillo y la



sensibilidad al 50% es de 93,62 pg/pocillo (Gráfica X).

**Reacciones cruzadas:** el límite de detección es de 4,5 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 195 pg/pocillo (Gráfica XIII).

**Progesterona:**

**En plasma:** el límite de detección es de 3 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 59,82 pg/pocillo (Gráfica VIII).

**En líquido folicular:** el límite de detección es de 6 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 75 pg/pocillo (Gráfica XI).

**Reacciones cruzadas:** el límite de detección es de 5,9 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 223,75 pg/pocillo (Gráfica XIV).

**Testosterona:**

**En plasma:** el límite de detección es de 6,6 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 83,17 pg/pocillo (Gráfica IX).

**En líquido folicular:** el límite de detección es de 6,1 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 81,7 pg/pocillo (Gráfica XII).

**Reacciones cruzadas:** el límite de detección es de 5,9 pg/pocillo y la sensibilidad al 50% es de 223,7 pg/pocillo (Gráfica XV).

Todos ellos se encuentran dentro de los límites señalados por los distintos autores (véase cuadros resumen) por lo que podemos afirmar que todas las técnicas validadas, son aptas para la determinación de estas tres hormonas esteroideas, en plasma y en líquido folicular bovino; pudiéndose determinar también las reacciones cruzadas que los anticuerpos producidos, poseen frente a otros esteroides.

### Análisis de los resultados obtenidos.

Una vez estandarizadas las técnicas de análisis hormonal se procedió al estudio estadístico de la población de hembras seleccionada.

En las tablas del anexo, están reflejados los resultados individuales de todas las hembras utilizadas en el estudio, divididas en los grupos ya aludidos. Se han recogido los resultados de los análisis de las tres hormonas esteroides (estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona) en sangre periférica y en los distintos tamaños foliculares presentes en los ovarios de cada hembra. También están recogidos los parámetros ováricos (peso, longitud, anchura, nº de folículos y volumen de cada uno de ellos). Con estos resultados individuales se realizó el estudio estadístico con ayuda del programa BMDP (Biomedical Data Program).

En la tabla 2 están reflejadas las medias ( $\pm$  E.S.M) de los parámetros hormonales y ováricos, determinadas en la población de hembras estudiada.

Las medias de las concentraciones sanguíneas de progesterona, estradiol-17 $\beta$  y testosterona se encuentran dentro de los valores fisiológicos aportados por los distintos autores para los días del ciclo estral en los que se ha desarrollado el estudio (Stabenfeldt et al., 1969; Hansel y Echterkamp, 1972; Wetteman et al., 1972; Schams et al., 1977; Ireland et al., 1979; Wise et al. 1982; Hansel y Convey, 1983; Peters, 1985; Schallenberger et al., 1985; Dobson y Kamonpatana, 1986). Como ya hemos señalado anteriormente, las hembras se seleccionaron siguiendo, fundamentalmente, el criterio de Ireland et al. (1980) y como hemos podido comprobar, el valor de progesterona se corresponde con el aportado por estos autores, de tal forma que las hembras se encontraban en el final de la fase III o en la fase IV de su clasificación (aproximadamente días 17-20 del ciclo), por lo que la elección de la población de hembras, en conjunto, es totalmente válida.

Las medias totales de los parámetros ováricos (peso, longitud, anchura,

número de folículos y volumen de cada tamaño folicular), no pueden ser comparadas con los de ningún autor, ya que están incluidas hembras de distintas edades y los autores consultados o bien se limitan a hembras de una sola edad, o si incluyen varias edades, no determinan la media total de la población (Reece y Turner, 1938; Asdell et al., 1949; Rajakoski, 1960; Aboule-Fadle et al., 1974; Ireland et al., 1979; Merz et al., 1981; McNatty et al., 1984; Dobson y Kamonpatana, 1986).

Con las medidas de las concentraciones de las hormonas esteroides foliculares también sucede lo mismo que con los parámetros ováricos, los distintos autores separan por tamaño folicular y edad la determinación de estas concentraciones (Ireland et al., 1979; Bellin et al., 1984; Bushmeyer et al., 1985; Braden et al., 1986; Fortune et al., 1988), estando los valores de nuestro estudio dentro del amplio margen fisiológico establecido por éstos.

En la tabla 3 están recogidas las medias ( $\pm$  E.S.M.) de todas las variables ováricas analizadas, según la situación del ovario (derecho o izquierdo). Con ellas se ha realizado un test de diferencia de medias y como se puede observar los valores de las medias de las concentraciones hormonales foliculares sólo son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en el caso del estradiol-17 $\beta$ , que presenta valores más elevados en el ovario derecho, por lo que en líneas generales se puede comprobar que este ovario posee una funcionalidad superior a la del izquierdo, y es en el que se va a desarrollar, en la mayoría de los casos, el folículo ovulatorio (Brantmeier et al., 1987; Pierson y Ginther, 1987 b).

En la tabla 4, se encuentran reflejadas las medias ( $\pm$  E.S.M.) de los valores de las variables estadísticas analizadas, en los distintos grupos animales, observándose diferencias en todas las variables, por lo que para comprobar si éstas eran estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) o no ( $p > 0,01$ ), se realizó un test de diferencia de medias, cuyos resultados se han recogido en las tablas 5-15.

Ya hemos señalado la influencia que la edad puede ejercer sobre la fisiología del ciclo estral bovino, lo que se puede comprobar por el gran número

de diferencias estadísticamente significativas que se han obtenido entre nuestros grupos. Asimismo, hemos señalado que la procedencia de los animales podría influir en los resultados; nuestros resultados confirman esta suposición, puesto que existen también grandes diferencias significativas entre los grupos control y problema, y entre las hembras de la misma edad.

Las medias de los valores sanguíneos de las tres hormonas esteroideas se encuentran en todos los grupos, dentro del rango señalado por los distintos autores para los días del ciclo estral a los que corresponden (Ireland et al., 1979; Hansel y Convey, 1983; Schallenberger et al., 1985; Dobson y Kamonpatana, 1986; Marcus y Durnford, 1986), excepto para los valores de estradiol-17 $\beta$  en los grupos problema 1 y 4 (vacas y terneras impúberes), que son un poco elevados: grupo 1:  $19,43 \pm 0,99$  pg/ml y grupo 4:  $25,45 \pm 4,14$  pg/ml. El rango señalado por los distintos autores en esta fase del ciclo estral (días 17-20), es bastante amplio (estradiol 17- $\beta$ :  $3,9 \pm 0,5$  -  $18 \pm 1,2$  pg/ml; progesterona:  $7,8 \pm 0,4$  -  $1,2 \pm 0,2$  ng/ml; testosterona:  $0,5 \pm 0,02$  -  $4,7 \pm 0,1$  ng/ml), por lo que aunque las representaciones gráficas del ciclo estral sean similares (gráficas 1, 2, 3 y 4), la diferencia entre los valores aportados por los distintos autores es enorme y pensamos que puede ser debida a las distintas técnicas analíticas empleadas, y de ahí la necesidad de validar nuestra técnica ELISA de competición, para todos los días del ciclo estral.

Los parámetros ováricos presentan asimismo grandes diferencias significativas según la edad, como era de esperar, existiendo éstas entre los grupos control y problema, en hembras de la misma edad. Las diferencias menos acusadas se hallan en el volumen medio de los folículos ováricos, en los que ni la edad, ni la procedencia de los animales guarda relación (tablas 5-15), ya que al ser el volumen medio de toda la población folicular, están en función del número de folículos presentes en los ovarios. Estos valores medios tampoco se corresponden con los aportados por otros autores (Reece y Turner, 1938; Asdell et al., 1949; Rajajoki, 1960; Ireland et al., 1979; Merz et al., 1981; McNatty et al., 1984; Dobson y Kamonpatana, 1986), siendo en nuestro caso ligeramente superiores en cuanto al peso y medidas ováricas, aunque esto puede ser debido a la raza de las hembras

analizadas en nuestro estudio. El número total de folículos, sin embargo, es inferior al aportado por los autores anteriormente mencionados y quizás pueda estar relacionado con el pequeño número de animales empleado por los mismos (5-10 animales).

Las medias de las concentraciones de las hormonas foliculares, son muy variables entre grupos, en el caso de la progesterona y testosterona, en el caso del estradiol-17 $\beta$  sólo existen diferencias estadísticamente significativas en el caso del grupo problema nº 4 (terneras impúberes) que las presenta con todos los grupos. Estas diferencias entre grupos están relacionadas con el número de folículos de distintos tamaños que poseen estas hembras puesto que, en cada tamaño folicular, la biosíntesis esteroide es distinta. Las hembras del grupo problema nº 4 sólo presentan un tamaño folicular (pequeños), por lo que es lógico que sus valores medios de concentración hormonal sean distintos a los del resto de los grupos, sobre todo en lo que se refiere al estradiol-17 $\beta$ .

En la tabla 16, se reflejan las medias ( $\pm$  E.S.M.) de todas las variables analizadas según los distintos tamaños foliculares. El hecho mas reseñable es que según predomine un tipo de tamaño folicular ésto se refleja en las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol-17 $\beta$ . En el caso de los folículos pequeños (T1, T2 y T3) las concentraciones plasmáticas de progesterona son más elevadas que en el resto de los tamaños de nuestra clasificación, mientras que las de estradiol-17 $\beta$  son menores. Con respecto a lo que ocurre con las concentraciones foliculares de las hormonas esteroides, en los folículos pequeños, no existe una diferencia tan marcada como en las plasmáticas, ésto se debe a que en estas medias están incluidos todos los folículos, sin hacer distinción de si son atreóticos o no (conociéndose la influencia que la atresia ejerce sobre las concentraciones foliculares de las citadas hormonas) (Moor et al., 1978; Bellin y Ax, 1984; Bushmeyer et al., 1985).

A medida que va aumentando el tamaño folicular (T4, T5 y T6) se puede comprobar que las concentraciones plasmáticas de progesterona van disminuyendo

y las de estradiol-17 $\beta$  aumentando, lo que significa que los acontecimientos que se producen en el folículo se van reflejando a nivel sanguíneo y además, coinciden con la fase del ciclo estral en la que se ha realizado este estudio.

En los folículos medianos (T4), las concentraciones foliculares de estas dos hormonas comienzan a diferenciarse observándose una ligera disminución de la progesterona y elevación del estradiol-17 $\beta$ . En los folículos grandes (T5 y T6) ya aparecen diferencias más marcadas: en los folículos T5, la progesterona disminuye y el estradiol-17 $\beta$  aumenta hasta alcanzar los niveles máximos, mientras que en los folículos T6 sucede lo contrario. Esto concuerda perfectamente con la predominancia en el líquido folicular de un esteroide sobre el resto, acompañado de que, como veremos mas adelante, en estos tamaños ya existe una clara diferenciación entre folículos atrésicos o no atrésicos (Ireland et al., 1979; Henderson et al., 1982; Dieleman et al., 1983; Ireland y Roche, 1983; Fortune y Hansel, 1985; Spicer y Zinn, 1987).

Respecto a las concentraciones plasmáticas de testosterona, no podemos afirmar que exista una clara influencia del ciclo estral sobre las mismas. No ocurre lo mismo a nivel folicular donde las concentraciones van disminuyendo a medida que aumenta el tamaño del folículo, ésto concuerda con los trabajos de Kruij y Dieleman (1985), que afirman que los folículos de tamaño pequeño (T1, T2 y T3) son ricos en testosterona (tabla nº 16), ya que ésta no puede aromatizarse para poder sintetizar estradiol-17 $\beta$ . A medida que el tamaño folicular aumenta, la esteroidogénesis cambia y la testosterona puede aromatizarse en estradiol-17 $\beta$ , por lo que las concentraciones foliculares de testosterona disminuyen (folículos T4, T5 y T6).

En el caso de los parámetros ováricos (peso, longitud, anchura, número de folículos y volumen de los mismos) como es lógico y dependiendo del número de folículos de cada tamaño que estén presentes en el ovario (Greenwald y Terranova, 1987; Wise, 1987; Fortune et al., 1988; Ginther et al., 1989 a; Roche y Boland, 1991), las medias de estos parámetros van a ser diferentes (tabla 16). Como es, por

ejemplo, el caso de los folículos T6, que son folículos de más de 20 mm, con un gran volumen de líquido folicular ( $6.43 \pm 2.63$  ml), en los que se aprecia una gran influencia sobre los otros tres parámetros ováricos.

Una vez estudiadas las medias de las distintas variables, el siguiente paso fue el estudiar las correlaciones generales existentes entre todas las variables analizadas, que se encuentran reflejadas en la tabla 17. Como se puede comprobar, los parámetros hormonales sanguíneos y foliculares se encuentran correlacionados entre sí, existiendo escasas correlaciones con los parámetros ováricos, por lo que no se incluyeron posteriormente en el estudio.

Son pocos los autores que han estudiado correlaciones entre niveles sanguíneos y foliculares, y entre las tres hormonas esteroides, limitándose a analizar sólo una o dos de estas hormonas a nivel sanguíneo (Ireland et al., 1979; Ireland y Roche, 1983; Schallenberger et al., 1984; Kruip y Dieleman, 1985; Wise, 1987), o realizando el estudio en otras fases del ciclo estral o del ciclo reproductor (gestación, período post-parto, lactación), o relacionando las diferencias existentes con la presencia o ausencia del cuerpo lúteo; por lo que la comparación de sus resultados con los nuestros es muy difícil de realizar (Pierson y Gimber, 1986; Quirk et al., 1986; Spicer et al., 1986 a, b; Brantmeier et al., 1987; Spicer y Zinn, 1987; Braden et al., 1989).

En líneas generales, podemos decir que la progesterona sanguínea está correlacionada negativamente (-99%) con el estradiol-17 $\beta$  y positivamente (99%) con la testosterona. El estradiol-17 $\beta$ , a su vez, presenta la misma correlación (99%) con la testosterona plasmática, es decir que cuando una de ellas sufre una elevación, la otra hormona también la experimenta. Esto se corresponde con la fase del ciclo estral analizada, ya que en esos días se puede comprobar (gráfica IV) que la progesterona va disminuyendo y el estradiol-17 $\beta$  se mantiene en niveles basales, los primeros días, para aumentar posteriormente; en cuanto a la testosterona aumenta y disminuye sin guardar ninguna relación con las otras dos hormonas.



En lo que respecta a las hormonas analizadas en el líquido folicular, la progesterona está correlacionada positivamente con las tres hormonas sanguíneas, aunque esta correlación es más débil con la testosterona (90%). El estradiol-17 $\beta$  no se correlaciona con la progesterona sanguínea, pero sí lo está y fuertemente con el estradiol-17 $\beta$  y con la testosterona, este comportamiento refleja la síntesis de estradiol-17 $\beta$  que tiene lugar durante esta fase del ciclo estral en los folículos antrales ováricos (Ireland et al., 1979). La testosterona folicular sólo está correlacionada con el estradiol-17 $\beta$  sanguíneo (90%), lo que puede deberse a que esta hormona es un precursor del estradiol-17 $\beta$  en la biosíntesis esteroide que tiene lugar en los folículos (Hansel y Convey, 1983).

Como dato curioso, señalar que el número de folículos presentes en el ovario está correlacionado negativamente con las concentraciones foliculares de estradiol-17 $\beta$  (-95%) y positivamente con la testosterona (99%), lo que puede deberse al gran número de folículos de pequeño tamaño presentes en el ovario y en los que, tal y como señalan Kruip y Dieleman (1985), la testosterona es el esteroide predominante.

El volumen de líquido folicular también presenta correlaciones con las hormonas foliculares: positiva con progesterona (90%) y estradiol-17 $\beta$  (99%) y negativa con la testosterona (-95%), lo que también está relacionado con la síntesis de estradiol-17 $\beta$  que tiene lugar en esta fase del ciclo.

Las hormonas foliculares no presentan ningún tipo de correlación general entre sí, quizás ésto se deba a la influencia que el grupo animal, tamaño folicular y día del ciclo estral poseen sobre ellas.

Una vez analizadas las correlaciones generales entre hormonas sanguíneas y foliculares, se pasó a realizar el estudio de correlación según el grupo animal y según el tamaño de folículo.

Las correlaciones entre hormonas sanguíneas y foliculares determinadas en

los distintos grupos de animales, se encuentran reflejadas en la tablas 18-24. Como se puede observar, las correlaciones son totalmente distintas en los grupos control y problema: en los grupos control no existe ningún tipo de correlación entre hormonas sanguíneas y foliculares, mientras que en los grupos problema, si existen correlaciones, aunque éstas van cambiando dependiendo de la edad de los animales. En el grupo problema 1 (vacas) aparece una fuerte correlación positiva (99%) entre la progesterona folicular y las tres hormonas sanguíneas (Progesterona, Estrason y Testoson), ésto puede ser debido a la dinámica folicular que tiene lugar en esa fase del ciclo estral en los ovarios de las hembras de este grupo, en los que predominan los folículos pequeños (anexo), en los que las concentraciones de progesterona y andrógenos son dominantes sobre las de estradiol-17 $\beta$ , lo que se va a reflejar en el comportamiento de las hormonas a nivel sanguíneo (Ireland y Roche, 1983; Krup y Dieleman, 1985; Ireland y Roche, 1987 a). Existe también una fuerte correlación positiva (99%) entre el estradiol-17 $\beta$  folicular y el estradiol-17 $\beta$  y la testosterona sanguíneos; como en el caso anterior es un fiel reflejo de lo que acontece a nivel ovárico, puesto que se está desarrollando el folículo dominante preovulatorio, muy rico en estradiol-17 $\beta$  y responsable del aumento de las concentraciones sanguíneas de esta hormona que se producen en esta fase del ciclo estral (Ireland y Roche, 1987 a). No está muy clara la influencia que ejerce el estradiol-17 $\beta$  folicular sobre las concentraciones de testosterona plasmática, aunque se conoce que las concentraciones de andrógenos aumentan cuando comienza la regresión del cuerpo lúteo (Wise et al., 1982), por otro lado, se ha señalado que el estradiol-17 $\beta$  folicular posee efecto hipoalítico y que los andrógenos actuarían sinérgicamente con él (Fogwell et al., 1985), por lo que el resultado final sería la elevación de las concentraciones plasmáticas de testosterona.

La correlación entre la testosterona folicular y el estradiol-17 $\beta$  sanguíneo es muy débil (90%), lo que podría deberse a que esta hormona es un precursor de la síntesis de estradiol-17 $\beta$ , en los folículos ováricos (Hansel y Conway, 1983).

En las Tablas 22-23, se han recogido las correlaciones que presentan los grupos problema 2 y 3 (novillas), estas hembras presentan las mismas correlaciones

sólo en dos de las tres hormonas foliculares (estradiol-17 $\beta$  y testosterona): la progesterona folicular no posee ningún tipo de correlación con las hormonas sanguíneas, lo que puede ser debido a que a pesar de que la población folicular es similar a la del grupo P1, el número de folículos de pequeño tamaño es menor, por lo que el folículo dominante, rico en estradiol-17 $\beta$ , ejerce una influencia mayor sobre el resto de los folículos, impidiendo que el efecto de sus concentraciones foliculares se refleje a nivel sanguíneo.

El estradiol-17 $\beta$  posee correlaciones con las tres hormonas sanguíneas (90 a 99%): negativa con la progesterona y positiva con estradiol-17 $\beta$  y testosterona. Como en el caso anterior, se puede comprobar que estas correlaciones se ajustan perfectamente a los acontecimientos que suceden en esta fase del ciclo estral a ambos niveles (Ireland et al., 1979; Hansel y Convey, 1983), siendo en este caso más marcado el efecto luteolítico del estradiol-17 $\beta$  (correlación negativa con la progesterona sanguínea: -95%). La explicación, en el caso de la testosterona, es similar a la apuntada para el grupo anterior (grupo problema 1). La testosterona folicular presenta el mismo patrón de comportamiento que el estradiol-17 $\beta$ ; la explicación de este fenómeno puede estar relacionada con una dominancia de testosterona en los folículos ováricos de pequeño tamaño, presentes en los ovarios de estas hembras (Kruip y Dieleman, 1985), que podría estar inversamente relacionada con las concentraciones de progesterona en este tamaño folicular y además, colabora en la función del estradiol-17 $\beta$  aumentando su efecto luteolítico.

Por último, en el grupo problema nº 4 (terneras), se observan escasas correlaciones entre hormonas sanguíneas y foliculares. En este caso, al tratarse de hembras impúberes, el ciclo estral no ejerce ningún tipo de influencia sobre las concentraciones hormonales, tanto plasmáticas como foliculares (González-Padilla et al., 1975; Schams et al., 1981). Como se puede comprobar en la tabla 4, las concentraciones sanguíneas de las tres hormonas, son elevadas en este grupo, de ahí que la correlación entre ellas sea positiva. Además, en este caso lo más destacable es la correlación negativa (-95%) existente entre las concentraciones de testosterona folicular y sanguínea, probablemente debida a una secreción continua de

testosterona desde el folículo a sangre periférica, ya que como se puede comprobar en la tabla 4 las concentraciones sanguíneas de testosterona en este grupo son muy elevadas y la población folicular está compuesta por folículos pequeños (T1 y T3) que son ricos en las tres hormonas (Kruip y Dieleman, 1985; Gore-Langton y Armstrong, 1988) y, también, la esteroidogénesis folicular, en estas hembras, puede no seguir las mismas vías que en las hembras púberes.

El tercer caso analizado ha sido la determinación de las correlaciones existentes entre las hormonas sanguíneas y foliculares según el tamaño del folículo. En este caso, las correlaciones se han determinado teniendo en cuenta la biosíntesis esteroide que tienen lugar en cada tamaño folicular (tabla 25).

Al realizar el análisis estadístico planteando el caso de que sólo existiesen en el ovario folículos de un tamaño concreto, se han obtenido los siguientes resultados. En los folículos T2 (2-5 mm) y T3 (0-5 mm), la progesterona plasmática presenta correlación directa (90 y 99%) con la folicular, esto puede ser debido al porcentaje de folículos atresícos que existen en la población folicular (tablas 26 y 28), los cuales son ricos en progesterona. El mismo comportamiento lo presentan los folículos T4 (5-10 mm), porque en este tamaño folicular se observa un gran porcentaje de folículos atresícos (tablas 26 y 28).

En los tamaños T2, T3 y T6 (>20 mm), se observan correlaciones directas (95-99%) con el estradiol-17 $\beta$  folicular. Existe una gran controversia entre los autores para la explicación de este fenómeno, nosotros creemos que estas correlaciones se encuentran asimismo relacionadas con los fenómenos de atresia que se producen en estos tamaños foliculares. El 100% de los folículos T6 de nuestro estudio son atresícos, y por esta razón presentan un coeficiente de correlación de 0,99 ( $p < 0,001$ ), y, como se puede comprobar en la tabla 16, las concentraciones de ambas hormonas son muy bajas.

Por último, la progesterona sanguínea tiene una correlación del 99% con la

testosterona folicular en el caso de los folículos T5 (10-20 mm) y como vemos en la tabla 16, en este tamaño folicular se observa una disminución en las concentraciones de ambas hormonas.

Al analizar los folículos pequeños (T1, T2 y T3), el estradiol-17 $\beta$  plasmático (tabla 25) presenta correlaciones con su homónimo folicular y con la testosterona folicular (99 y 95%, respectivamente); los folículos T3 presentan además correlación positiva (99%) con la progesterona folicular. La explicación a estos fenómenos puede ser debida, como ya hemos señalado anteriormente, a la esteroidogénesis que tiene lugar en estos tamaños foliculares y dependiendo de si estos folículos están en crecimiento (en ellos, la testosterona se encuentra en concentraciones elevadas, ya que es el sustrato para la síntesis de estradiol-17 $\beta$ , en esta especie) o han entrado en el proceso de atresia (la progesterona está en concentraciones elevadas, debido a la pérdida de la capacidad de aromatización de la testosterona en estradiol-17 $\beta$ ). En los folículos T1 y T2, el porcentaje de no atrésicos es superior al de atrésicos (tablas 26 y 28), por lo que es lógico que posea correlación directa con el estradiol-17 $\beta$  y con la testosterona. En el caso de los folículos T3 están al 50% y las concentraciones de las tres hormonas foliculares son elevadas por lo que no se puede asegurar cual de los dos tipos está marcando la pauta sobre las concentraciones plasmáticas del estradiol-17 $\beta$ , de ahí que presente correlaciones positivas con las tres hormonas foliculares.

En los folículos T4, los procesos de biosíntesis esteroide dependen de los mismos factores que en los casos anteriores, sin embargo; ésto no está claramente reflejado a nivel plasmático, ya que existen correlaciones con la progesterona y testosterona foliculares y no con el estradiol-17 $\beta$ , estas correlaciones podrían ser el resultado de la influencia que el folículo dominante ejerce sobre la población de folículos de este tamaño (Ireland et al., 1983; Ireland, 1987 a, b).

Sobre los folículos T5 sí existe una clara influencia de la fase del ciclo estral en la que se haya realizado el estudio. De este tamaño folicular va a surgir el folículo dominante y ovulatorio, en el cual se va a sintetizar estradiol-17 $\beta$  en

grandes cantidades. Como podemos observar, existe una correlación negativa (- 99%) con las concentraciones de progesterona en líquido folicular y correlaciones positivas (99 y 90%) con las restantes hormonas foliculares. Estas correlaciones son un fiel reflejo de la funcionalidad del folículo dominante en esta fase del ciclo estral (Wise et al., 1987).

Por último, la testosterona plasmática presenta correlación directa (99%) con la progesterona folicular en los tamaños T3 y T4, que puede estar relacionada con el crecimiento folicular, tal y como señalan Wise et al. (1987), si bien, no encuentran ninguna explicación a este fenómeno.

En los tamaños T2, T3 y T5 esta hormona presenta correlación directa con el estradiol-17 $\beta$  folicular, lo que está relacionado, como en el caso de la hormona anterior, con la esteroidogénesis que se produce en estos tamaños foliculares.

Sólo existe correlación con la testosterona del líquido folicular en los folículos T4. Como se puede observar, en estos folículos se producen las mismas correlaciones que en el caso del estradiol-17 $\beta$  sanguíneo, por lo que quizás la explicación aportada anteriormente, sirve también para esta ocasión.

#### Determinación de la atresia folicular: clasificación endocrina.

Uno de los capítulos que todavía permanece oscuro, dentro de la fisiología de la folliculogénesis bovina, es la atresia folicular. Aún no se conocen los mecanismos reguladores o inhibidores que determinan que dentro del grupo de los folículos antrales en crecimiento que existen en el ovario de esta especie, sólo uno (en algunas ocasiones dos) se desarrolle en su totalidad y llegue a romperse, mientras que los folículos restantes entren en el proceso de atresia (Greenwald y Terranova, 1987). En el análisis de las correlaciones hemos señalado las grandes diferencias existentes entre los grupos de animales y los tamaños foliculares y hemos pensado, que este factor puede ejercer una influencia decisiva sobre ellas,

por lo que lo hemos incluido en el estudio.

Existen tres tipos de clasificación de la atresia folicular: morfológico (Rajakoski, 1960; Moor et al., 1978), endocrino (Ireland y Roche, 1982, 1983) y una mezcla de ambos (Kruip y Dieleman, 1982, 1985; McNatty et al., 1984). De entre ellos, hemos elegido el criterio endocrino propuesto por Kruip y Dieleman (1985) para estudiar la atresia de la población folicular presente en cada grupo animal o en cada tamaño folicular, de nuestro estudio, puesto que está claro que la predominancia de uno u otro esteroide en el líquido folicular de los folículos ováricos antrales está íntimamente relacionada con los fenómenos de atresia, aunque la relación entre la aparición de los signos morfológicos y endocrinos de la atresia todavía no esté muy clara (Centola, 1983). De ahí la necesidad de estandarizar la técnica de determinación hormonal para el líquido folicular.

Kruip y Dieleman, proponen tres tipos de atresia según las relaciones entre los tres tipos de hormonas foliculares (Progesterona, Estradiol-17 $\beta$  y Testosterona): Atresia tipo 1: E2-17 $\beta$ /P4; Atresia tipo 2: E2-17 $\beta$ /T y Atresia tipo 3: E2-17 $\beta$ /P4 + T. Para que un folículo se pueda clasificar como no atrésico estas relaciones tienen que ser mayores que 1. Wise (1987) invierte estas relaciones, debido a que encuentra más significativo relacionar la predominancia de andrógenos y progestágenos con los estrógenos. El resultado final es el mismo y a nosotros nos pareció más correcta la primera clasificación.

Una vez establecidos los criterios para la determinación de la atresia se procedió a determinar los porcentajes de folículos atrésicos y no atrésicos en cada tamaño folicular, en los distintos grupos animales y según la situación del ovario. Estos resultados se encuentran reflejados en las tablas 26 a 31.

En las tablas 26, 27 y 28 están indicados los porcentajes de folículos atrésicos y no atrésicos en cada tipo de atresia y según el tamaño de folículo. Con ello se han intentado establecer las diferencias en el número de folículos de una y otra clase, con el fin de determinar cuál es el tipo de atresia adecuada a cada

tamaño folicular.

Una vez comparados los porcentajes obtenidos, en cada tipo de atresia, se eliminó el tipo 2 por no reflejar ninguno de los procesos de esteroidogénesis que se producen en el desarrollo o crecimiento folicular, y que viene determinado en los distintos tamaños foliculares por las concentraciones de la hormonas esteroides analizadas.

En los folículos pequeños (T1, T2 y T3), las concentraciones de testosterona son más elevadas que en el resto de los tamaños foliculares (tabla 16) y las de las dos hormonas restantes también son altas. Todos los autores coinciden en que los folículos pequeños en crecimiento son ricos en testosterona y, al emplear como criterio de atresia los tipos 2 y 3, el número de folículos atrésicos se incrementa artificialmente, por lo que entendemos que el criterio endocrino más adecuado para este tamaño folicular sería el de atresia tipo 1: E2-17 $\beta$ /P<sup>4</sup>, que reflejaría la total abolición de la función esteroidogénica de las células de la granulosa, mientras que aún se mantiene en alguna medida la de las células de la teca interna, que son las últimas en degenerar en el proceso de atresia (Moor et al., 1978; Wise, 1987). En la tabla 26 se observa cómo en este tamaño folicular (T1, T2 y T3) existen diferencias entre los tamaños de nuestra clasificación, puesto que el porcentaje de folículos no atrésicos es superior al de atrésicos en los folículos T1 y T2 o igual en los folículos T3.

En los folículos grandes (T5), nos inclinamos por la clasificación de atresia tipo 3: E2-17 $\beta$ /P<sup>4</sup> + T, por considerar que en estos folículos y en la fase del ciclo estral [fase de crecimiento y diferenciación del folículo dominante preovulatorio (Ireland y Roche, 1987)], la esteroidogénesis se decanta hacia una gran producción de estradiol-17 $\beta$ , por lo que la aparición de concentraciones elevadas de progesterona y/o andrógenos en el líquido folicular marcarían el inicio de los procesos de atresia por la pérdida en la capacidad de síntesis de estradiol-17 $\beta$  (Ireland y Roche, 1982). Además, comparando los criterios morfológicos y endocrinos de atresia, aportados por algunos autores (Kruip y Dieleman, 1982,



1985; McNatty et al., 1984), en los que clasifican los folículos en: no atrésicos, ligeramente atrésicos y atrésicos, pensamos que el criterio de atresia tipo 3 engloba estos 2 tipos de folículos atrésicos, aunque, si no fuese posible calcular la atresia tipo 3, es totalmente factible utilizar la atresia tipo 1, al no existir grandes diferencias entre ambos tipos de criterios (tablas 26 y 28).

En el caso de los folículos medianos (T4) nos inclinamos por el anterior criterio (tipo 3), debido a que estos folículos forman parte del grupo o cohorte de folículos que acompañan al folículo o folículos grandes dominantes (Fortune et al., 1988; Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989 a), y es sobre los que éstos ejercen principalmente su dominancia, de ahí que, como se ve en la tabla 28, exista un porcentaje ligeramente superior de folículos atrésicos.

Los folículos T6 (>20 mm), clasificados como quísticos en esta especie (Fortune y Hansel, 1985), presentan el 100% de atresia en cualquiera de los dos criterios de atresia elegidos, por lo que en este tamaño folicular ambos serían válidos.

La distribución de estos porcentajes, en los distintos grupos de animales, es diferente y está relacionada con la edad de los mismos. Se puede observar que no existen grandes diferencias entre grupos control y problema: en las vacas (grupos C1 y P1) el porcentaje de folículos no atrésicos es inferior al de atrésicos, utilizando los criterios endocrinos señalados.

En los grupos de novillas (grupos C2, P2 y P3), la población folicular es ligeramente distinta, por lo que la distribución de los porcentajes varía de unos grupos a otros (tablas 29 y 30). En este caso sí que influye el criterio de atresia elegido, puesto que como podemos comprobar en las citadas tablas, en el caso de la atresia tipo 1, el porcentaje se inclina hacia una mayoría de los folículos no atrésicos, mientras que en el tipo 2, es justo al contrario. Creemos que debido a la fase del ciclo en la que se ha realizado el estudio (fase folicular), el criterio de atresia tipo 1 es el más adecuado para las hembras de esta edad.

Las hembras impúberes (grupo P4) no están sujetas a la influencia del ciclo estral y debido a la población folicular que presentan en sus ovarios (T1 y T3, ricos en testosterona), el criterio de atresia adecuado sería el tipo 1 (tablas 29 y 30).

En la tabla 31 se encuentran recogidos los porcentajes de folículos atrésicos y no atrésicos considerando cada tipo de atresia y agrupándolos por situación del ovario. Como se puede comprobar existen grandes diferencias dependiendo del tipo de atresia; en los tipos 1 y 2 los folículos no atrésicos predominan sobre los atrésicos y la funcionalidad del ovario derecho es superior a la del izquierdo, al existir un porcentaje menor de folículos atrésicos en este ovario. Sin embargo, en la atresia tipo 3, se invierten, tanto la predominancia de los folículos no atrésicos sobre los atrésicos, como la funcionalidad de los ovarios, predominando el izquierdo sobre el derecho. En este caso, pensamos que el criterio de elección es el tipo 1, puesto que como ya señalamos en la tabla 2, las concentraciones de estradiol-17 $\beta$ , determinadas en todos los ovarios derechos, son superiores a las del izquierdo, signo de una mayor funcionalidad en este lado.

El último paso de nuestro estudio consistió en trazar las rectas de regresión entre las concentraciones sanguíneas y foliculares de las tres hormonas esteroideas (estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona). En el cálculo se incluyeron todos los grupos de animales analizados y todos los tamaños foliculares. Estas rectas se trazaron con el fin de comprobar si los acontecimientos que se producen a nivel folicular se reflejan a nivel sanguíneo y viceversa, es decir, que mediante la determinación de las concentraciones plasmáticas de las hormonas mencionadas y mediante una fórmula matemática, se pueden calcular las concentraciones totales de las mismas en todos los folículos del ovario, lo que puede ser una manera de expresar la funcionalidad ovárica de una hembra.

Las rectas de regresión están representadas en las gráficas XVI-XXIV, en este capítulo vamos a reflejar las fórmulas de estas rectas de regresión:

#### ESTRADIOL-17 $\beta$ :

- a) Regresión de estradiol-17 $\beta$  plasmático sobre progesterona folicular.

$$Y = 69,382 + 2,058X$$

$$p < 0,001$$

- b) Regresión de estradiol-17 $\beta$  plasmático sobre estradiol-17 $\beta$  folicular.

$$Y = 94,574 + 3,0641X$$

$$p < 0,01$$

- c) Regresión de estradiol-17 $\beta$  plasmático sobre testosterona folicular.

$$Y = 28,999 + 0,43228X$$

$$p < 0,001$$

#### PROGESTERONA:

- a) Regresión de progesterona plasmática sobre progesterona folicular.

$$Y = 85,761 + 9,6236X$$

$$p < 0,001$$

- b) Regresión de progesterona plasmática sobre estradiol-17 $\beta$  folicular.

$$Y = 127,58 + 10,734X$$

$$p < 0,001$$

- c) Regresión de progesterona plasmática sobre testosterona folicular.

$$Y = 33,659 + 1,5127X$$

$$p < 0,01$$

#### TESTOSTERONA:

- a) Regresión de testosterona plasmática sobre progesterona folicular.

$$Y = 84,493 + 13,662 X$$

$$p < 0,001$$

- b) Regresión de testosterona plasmática sobre estradiol-17 $\beta$  folicular.

$$Y = 96,120 + 32,084X$$

$$p < 0,01$$

- c) Regresión de testosterona plasmática sobre testosterona folicular.

$$Y = 35,992 + 0,72760X$$

$$p = 0,547$$

Como se puede comprobar en las fórmulas, todas las rectas de regresión son estadísticamente significativas excepto la regresión de la testosterona sanguínea sobre la testosterona folicular, por lo que se podría afirmar que, en general es posible predecir las concentraciones plasmáticas o foliculares de estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona de hembras de ganado vacuno, de todas las edades, mediante la aplicación de estas fórmulas matemáticas, en los días del ciclo estral en los que se ha llevado a cabo este estudio.

## **CONCLUSIONES**

Una vez analizados los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos sacar de ellos las siguientes conclusiones:

**1ª CONCLUSION:** Se ha demostrado que la técnica ELISA de competición en microplaca, puesta a punto y validada por nosotros, reúne las características apropiadas en cuanto a especificidad, sensibilidad y repetibilidad, para la determinación de las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides, estradiol-17 $\beta$ , progesterona y testosterona en plasma bovino.

**2ª CONCLUSION:** Se ha desarrollado y validado la técnica ELISA de competición directa y en microplaca, para la determinación de las concentraciones de las tres hormonas esteroides antes citadas, en líquido folicular bovino, con unos resultados comparables a los hallados con otras técnicas analíticas de determinación hormonal.

**3ª CONCLUSION:** La técnica ELISA FIS, desarrollada por nosotros, es sencilla, rápida, repetible y fácilmente ejecutable, lo que la hace idónea para la evaluación del título de anticuerpos policlonales producidos frente a hormonas esteroides.

**4ª CONCLUSION:** Se ha comprobado que la edad, la fase del ciclo estral y el tamaño folicular, ejerce en la vaca una influencia decisiva sobre las concentraciones plasmáticas y foliculares de las tres hormonas esteroides analizadas, lo que se ha comprobado con el análisis de las correlaciones encontradas.

**5ª CONCLUSION:** La utilización de un criterio endocrino de clasificación de la atresia folicular en la vaca, es totalmente válida, siempre y cuando se tenga en cuenta la fase del ciclo estral, el tamaño de folículo y el esteroide folicular predominante en cada caso.

**6ª CONCLUSION:** Es posible determinar la funcionalidad ovárica en esta especie mediante los acontecimientos que tienen lugar a nivel sanguíneo, tal y como se demuestra en el estudio de la regresión realizada entre concentraciones sanguíneas y foliculares de las tres hormonas analizadas.

**CONCLUSION FINAL:** Podemos concluir diciendo que la técnica ELISA de competición es válida para la determinación de hormonas esteroides sanguíneas y foliculares en ganado vacuno. Las correlaciones encontradas entre los acontecimientos sanguíneos y foliculares, reflejan la influencia decisiva que sobre ellas ejercen la fase del ciclo estral, la edad y el tamaño folicular.

## **BIBLIOGRAFIA**



- ABEYAWARDENE, S.A. y G.S. POPE.- The involvement of progesterone and luteinizing hormone in the termination of the post-ovulatory rise in plasma oestradiol-17 $\beta$  concentration in cattle.  
Anim. Reprod. Sci. 15: 27-36, 1987.
  
- ABOULE-FADLE, S.W., M.F.A. FAHMY y S.M. EL-SHAFFEY.- Histological studies on the follicles with special reference to their atresia in Egyptian buffaloes.  
Zentbl. Vet. Med. 21: 660-670, 1974.
  
- ABRAHAM, G.E.- Solid phase radioimmunoassay of estradiol-17 $\beta$ .  
J. Clin. Endocr. Metab. 29: 866-870, 1969.
  
- ABRAHAM, G.E.- Radioimmunoassay of steroids in biological fluids.  
J. Steroid Biochem. 6: 261-270, 1975.
  
- ABRAHAM, G.E.- Characterization of anti-steroid antisera. En: Steroid immunoassay, Proceedings of fifth Tenovus workshop, editado por E.H.D. Cameron, S.G. Hillier y K. Griffiths. Alpha-Omega Publishers Ltd. Cardiff, 1975, p: 67-78.
  
- ABUKNESHA, R. y D. EXLEY.- Design and development of oestradiol-17 $\beta$  enzyme-immunoassay. En: Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter & Co. Berlin - New York, 1978, p: 139-152.
  
- ADEYEMO, O., U.U. AKPOKODJE y P.I. ODILI.- Estrous cycles in Bos indicus and Bos taurus heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate.  
Zentbl. Vet. Med. A 26: 788-799, 1979.

- ANDERSON, G.W., J.E. ZIMMERMAN y F.M. CALLAHAN.- The use of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis.  
J. Am. Chem. Soc. 86: 1839-1843, 1964.
- ANDRIEU, J.M., S. MAMAS y F. DRAY.- Viroimmunoassay of steroids.  
En: Steroid immunoassay, editado por A.H.D. Cameron, S.G. Hillier y K. Griffiths. Alpha Omega Publishers. Cardiff, 1975, p: 189-198.
- ARAKAWA H., M. MAEDA y A. TSUJI.- Chemiluminescence enzyme immunoassay of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone using glucose oxidase and bis (2,4,6-trichlorophenyl) oxalate-fluorescent dye system.  
Chem. Pharm. Bull. 30: 303-309, 1982.
- ARAKAWA, H., M. MAEDA, A. TSUJI, H. NATUSE, E. SUZUKI y A. KAMBEGAWA.- Fluorescence enzyme immunoassay of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in dried blood samples on filter papers and its application to mass screening for congenital hyperplasia.  
Chem. Pharm. Bull. 31: 2724-2731, 1983.
- ARMSTRONG, D.T. y H. PAPHOFF.- Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats "in vivo" by follicle-stimulating hormone.  
Endocrinology 99: 1144-1151, 1976.
- ARNSTADT, K.I. y W.F. CLEERE.- Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows.  
J. Reprod. Fert. 62: 173-180, 1981.
- ARNSTADT, K.I. y B. SCHMIDT-ADAMPOULOU.- Direct enzymeimmunoassay for determination of progesterone in milk from cows.  
Br. vet. J. 138: 436-448, 1982.

- ARNSTADT, K.I.- Steroid determination in milk by enzyme immunoassay (EIA).  
J. Steroid Biochem. 19: 423-424, 1983.
- ASDELL, S.A., J. DE ALBA y S.J. ROBERTS.- Studies on the estrous cycle of dairy cattle: cycle length, size of corpus luteum, and endometrial changes. Cornell Vet. 39: 389-402, 1949.
- BAUMINGER, S. F. KOHEN y H.R. LINDNER.- Steroids as haptens: optimal design of antigens for the formation of antibodies to steroid hormones.  
J. Steroid Biochem. 5: 739-747, 1974.
- BAUMINGER, S. y M. WILCHEK.- The use of Carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates.  
Methods in Enzymology. 70: 151-155, 1980.
- BELLIN, M.E. y R.L. AX.- Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles.  
Endocrinology. 144: 428-434, 1984.
- BELLIN, M.E., M.M. HINSHELWOOD, E.R. HAUSER y R.L. AX.- Influence of suckling and size of corpus luteum or pregnancy on folliculogenesis in postpartum cows.  
Biol. Reprod. 31: 849-855, 1984.
- BERSON, S.A. y R.S. YALOW.- Isotopic tracers in the study of diabetes. Adv. Biol. Med. Phys. 6: 349-355, 1958.
- BERTOFT, E., J.U. ESKOLA, V. NANTO y T. LOVGREN.- Competitive solid-phase immunoassay of testosterone using time-resolved fluorescence. FEBS Letters. 173: 213-216, 1984.

BIERLEY, D.J., J.G. BERARDINELLI, R.B. STAIGMILLER y R.E. SHORT.- Progesterone concentrations in beef heifers bred at puberty on third estrus.

J. Anim. Sci. 65: 1571-1575, 1987.

BLAKE, C. y B.J. GOULD.- Use of enzymes in immunoassay techniques. A review.

Analyst. 109: 533-547, 1984.

BOSCH, A.M.G., F.C. den HOLLANDER y G.F. WOODS.- Specificities of antisera against testosterone linked to albumin at different positions (C3, C11, C17).

Steroids. 23: 699-711, 1974.

BOSCH, A.M.G., H. VAN HELL, J. BRANDS y A.H.W.M. SCHULERS.- Specificity, sensitivity and reproducibility of enzyme-immunoassays. En: Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter & Co. Berlin-New York, 1978, p: 175-187.

BOSCH, A.M.G., H. VAN HELL, J. BRANDS, A.H.W.M. SCHULERS y B.M. VAN WEEMEN.- Enzyme-immunoassay for hormones: preparation of tracer; comparison with radioimmunoassay. En: Immunoassay and assay techniques, editado por R. Malvano. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands, 1980, p: 1-15.

BRADEN, T.D., J.G. MANNS, D.L. CERMAK, T.N. NETT y G.D. NISWENDER.- Follicular development following parturition and during the estrous cycle in beef cows.

Theriogenology. 25: 833-843, 1986.

- BRADEN, T.D., M.E. KING, K.G. ODDE y G.D. NISWENDER.- Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows.  
J. Reprod. Fert. 85: 97-104, 1989.
- BRADFORD, M.M.- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254, 1976.
- BRANTMEIER, S.A., M.E. BELLIN, S.K. BOEHM, S.M. BUSHMEYER, R.R. GRUMMER y R.L. AX.- Influence of stage of cycle, corpus luteum location, follicle size, and number of large follicles on estradiol-17 $\beta$  concentrations in bovine follicles.  
J. Dairy Sci. 70: 2138-2144, 1987.
- BURNET, F.M.- The clonal selection theory of immunity, editado por Vanderbilt and Cambridge University Presses, New York and London. 1959.
- BURRELS, C. y A. McL. DAWSON.- ELISA methodology: variations in technical procedures. En: The ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis, editado por R.C. Wardley y J.R. Crowther. Martinus Nijhoff Publishers. The Hague/Boston/London, 1982, p: 1-9.
- BUSHMEYER, S.M., M.E. BELLIN, S.A. BRANTMEIER, S.K. BOEHM, C.L. KUBAJAK y R.L. AX.- Relationships between bovine follicular fluid, glycosaminoglicans and steroids.  
Endocrinology. 117: 879-885, 1985.
- BUTLER, J.E.- Antibody-antigen and antibody-hapten reactions. En: Enzyme-Immunoassay, editado por E.T. Maggio. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 5-70.

BYSKOV, A.G.- Atresia. En: Ovarian follicular development and function, editado por A.R. Midgley y W.A. Sadler. Raven Press, New York, 1979, p: 41-57.

CATTY, D. y C. RAYKUNDALIA.- Production and quality control of polyclonal antibodies. En: Antibodies. A practical approach. Vol I, editado por D. Catty. IRL Press, 1988, p: 19-41.

CATTY, D. y C. RAYKUNDALIA.- ELISA and related immunoassays. Standarization of ELISA. En: Antibodies. A practical approach. Vol II, editado por C. Catty. IRL Press, 1988, p: 149-153.

CEKAN, Z.- Assesment of reliability of steroid radioimmunoassays. J. Steroid Biochem. 6: 271-275, 1975.

CENTOLA, G.M.- Structural changes: atresia. En: The Ovary, editado por G.B. Serra. Raven Press, New York, 1983, p: 113-122.

CHANG, C.F. y V.L. ESTERGREEN.- Development of a direct enzyme immunoassay of milk progesterone and its application to pregnancy diagnosis in cows. Steroids. 41: 173-195, 1983.

CHESWORTH, J.M. y M.P. EASDON.- Effect of diet and season on steroid hormones in the ruminant. J. steroid Biochem. 19: 715-723, 1983.

CHOUDARY, J.B., H.T. GIER y G.B. MARION.- Cyclic changes in bovine vesicular follicles. J. Anim. Sci. 27: 468-471, 1968.

- CLARK, C.F.- Does the right ovary function more frequently than the left.  
J. Amer. Vet. Med. Assn. 88: 62-65, 1936.
- CLARK, B.R. y E. ENGVALL.- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspects. En: Enzyme-Immunoassay, editado por E.T. Maggio. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 167-196.
- COLL, J.M.- Development of a fast solid-phase enzyme immunoassay for C-reactive protein.  
Revista Española de Fisiología. 44: 359-368, 1988.
- CORRIE, J.E.T., W.M. HUNTER y J. MACPHERSON.- Estrategy for radioimmunoassay of plasma progesterone with the use of a homologous site <sup>125</sup>I-labelled radioligand.  
Clin. Chem. 27: 594-599, 1981.
- DAWSON E.C., A.E.H.C. DENISSEN y B.K. VAN WEEMEN.- A simple and efficient method for raising steroid antibodies in rabbits.  
Steroids. 37: 357-366, 1978.
- DE BOEVER, J.F. KOHEN y D. VANDENKERCKOVE.- Solid-phase chemiluminiscence immunoassay for plasma estradiol-17 $\beta$  during gonadotrophin therapy compared with two radioimmunoassays.  
Clin. Chem. 29: 2068-2072, 1983.
- DE BOEVER, J.F. KOHEN y D. VANDENKERCKOVE y A. VAN MAEDE.- Solid-phase chemiluminiscence immunoassay for progesterone in unrestricted serum.  
Clin. Chem. 30: 1637-1641, 1984.

- DE BOEVER, J.F., F. KOHEN, C. USANACHITT, D. VANDENKERCKOVE, D. LEYSEELE y L. VANDEWALLE.- Direct chemiluminescence immunoassay for estradiol in serum. Clin. Chem. 32: 1895-1900, 1986.
- DEN HOLLANDER, F.C., B.K. VAN WEEMEN y G.F. WOODS.- Specificities of antisera against estrogens linked to albumin at different positions (C6, C11, C16, C17). Steroids. 23: 549-560, 1974.
- DESJARDINS, C. y H.D. HAFS.- Levels of pituitary follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in heifers from birth through puberty J. Anim. Sci. 27: 472-480, 1968.
- DHAR, T.K., A.K. SAMANTA y E. ALL.- Homogeneous enzyme immunoassay of estradiol using estradiol-3-O-Carboxymethyl ether as hapten. Steroids. 51: 519-526, 1988.
- DIELEMAN, S.J., M.M. BEVERS, J. POORTMAN y H.T.M. VAN TOL.- Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. J. Reprod. Fertil. 69: 641-649, 1983.
- DIELEMAN, S.J., M.M. BEVERS, H.T.M. VAN TOL y A.M. WILLEMSE.- Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the oestrus cycle in the cow, with emphasis on the post-oestrus period. Anim. Reprod. Sci. 10: 275-292, 1986.



- DIELEMAN, S.J. y M.M. BEVERS.- Development of preovulatory follicles in the cow from luteolysis until ovulation. En: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*, editado por J.F. Roche y D.O. O'Callaghan. Martinus Nijhoff Publishers, 1987, p:31-34.
  
- DOBSON, H.- Plasma gonadotropins and oestradiol during oestrus in the cow.  
*J. Reprod. Fert.* 52: 51-53, 1978.
  
- DOBSON, H. y M. KAMONPATANA.- A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu.  
*J. Reprod. Fert.* 77: 1-36, 1986.
  
- DODSON, S.E., B.J. Mc LEOD, W. HARESIGN, A.R. PETERS y G.E. LAMMING.- Endocrine changes from birth to puberty in the heifer.  
*J. Reprod. Fert.* 82: 527-538, 1988.
  
- DRAY, F., J.M. ANDRIEU y F. RENAUD.- Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using  $\beta$ -galactosidase as label.  
*Biochem. Biophys. Acta* 403: 131-138, 1975.
  
- DRESSER, D.W.- Immunization of experimental animals. En: *Immunochimistry: An advanced textbook*, editado por L.E. Glynn y M.W. Steward. John Wiley and Sons, Chichester, New York, 1977, p: 602-623.
  
- DRIANCOURT, M.A.- Follicular dynamics in sheep and cattle.  
*Theriogenology* 35: 55-79, 1991.

- DUFOUR, J., H.L. WHITMORE, O.J. GINTHER y L.E. CASIDA.- Identification of the ovulating follicle by its size on different days of the estrous cycle in heifers.  
J. Anim. Sci. 34: 85-87, 1972.
- DUVAL, D., B. DESFOSSES y R. EMILIOZZI.- Preparation of dehydroepiandrosterone, testosterone, and progesterone antigens through 7-carboxymethyl derivatives: Characteristics of the antisera to testosterone and progesterone.  
Steroids. 35: 235-249, 1980.
- EDWARDS, R.G.- Follicular fluid.  
J. Reprod. Fert. 37: 189-219, 1974.
- ELDER, P.A. y J.G. LEWIS.- An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma testosterone.  
J. Steroid Biochem. 22: 635-638, 1985.
- ELLENS, D.J. y P.V. de LEEUW.- Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Rotavirus infections in calves.  
J. Clin. Micro. 10: 530-532, 1977.
- ENGLAND, B.G., H.J. KARAVOLAS, E.R. HAUSER y L.E. CASIDA.- Ovarian follicular estrogens in Angus heifers.  
J. Anim. Sci. 37: 1176-1179, 1973.
- ENGVALL, E. y P. PERLMANN.- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.  
Immunochemistry. 8: 871-874, 1971.

- ENGVALL, E. y P. PERLMANN.- Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.  
J. Immunol. 109: 129-135, 1972.
- ENGVALL, E.- Enzyme immunoassay ELISA and EMIT.  
Methods in Enzymology. 70: 419-439, 1980.
- ERICKSON, G.F., D.A. MAGOFFIN, C.A. DYER y C. HOFEDITZ.- The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships.  
Endocr. Rev. 6: 371-399, 1985.
- ERLANGER, B.F., F. BOREK, S.M. BEISER y S. LIEBERMAN.- Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone.  
J. Biol. Chem. 228: 713-727, 1957.
- ERLANGER, B.F., F. BOREK, S.M. BEISER y S. LIEBERMAN.- Steroid-protein conjugates. II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone, and estrone.  
J. Biol. Chem. 234: 1090-1094, 1959.
- ERLANGER, B.F.- The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey.  
Methods in Enzymology 70: 85- 104, 1980.
- EXLEY, D., M.W. JOHNSON y P.D.G. DEAN.- Antisera highly specific for 17 $\beta$ -oestradiol.  
Steroids. 18: 605-620, 1972

- EXLEY, D. y B. WOODHAMs.- The specificity of antisera raised by oestradiol-17 $\beta$ -3-hemisuccinyl bovine serum albumin.  
Steroids. 27: 813-820, 1976.
- EXLEY, D. y R. ABUKNESH.A.- The preparation and purification of a  $\beta$ -D-galactosidase-oestradiol-17 $\beta$  conjugate for enzyme immunoassay.  
FEBS Lett. 79: 301-304, 1977.
- EXLEY, D. y R. ABUKNESH.A.- A highly sensitive and specific enzyme-immunoassay method for oestradiol-17 $\beta$ .  
FEBS Lett. 91: 162-165, 1978.
- FANTL, V.E., D.Y. WANG y R.E. KNYBA.- The production of high affinity monoclonal antibodies to progesterone.  
J. Steroid Biochem. 19: 125-130, 1982.
- FANTL, V.E. y D.Y. WANG.- Characterization of monoclonal antibody raised against testosterone.  
J. Steroid Biochem. 19: 1605-1610, 1983.
- FANTL, V.E. y D.Y. WANG.- Simultaneous production of monoclonal antibodies to dehydroepiandrosterone, oestradiol, progesterone and testosterone.  
J. Endocr. 100: 367-376, 1984.
- FAROOKHI, R.- Atresia: An hypothesis. En: Dynamics of ovarian function, editado por N.B. Schwartz y M. Hunzicker-Dunn. Raven Press, New York, 1981, p: 13-23.
- FIELDS, R.- The measurement of amino groups in proteins and peptides.  
Biochem. J. 124: 581-590, 1971.

- FOLMAN, Y., M. ROSENBERG, I. ASCARELLI, M. KAIM y Z. HERZ.-  
The effect of dietary and climatic factors on fertility, and on plasma  
progesterone and oestradiol-17 $\beta$  levels in dairy cows.  
J. steroid Biochem. 19: 863-868, 1983.
  
- FOREST, M.G., E. MAPPUS y C. CUIILLERON.- O-(carboxymethyl) oxime  
steroidal haptens linked in the C3 position: study of the characteristics of  
antibodies against 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and testosterone and of their  
evolution with time.  
Steroids. 28: 815-827, 1976.
  
- FORTUNE, J.E. y W. HANSEL.- Modulation of thecal progesterone  
secretion by estradiol-17 $\beta$ . En: Ovarian follicular and corpus luteum function,  
editado por C.P. Channing, J.M. Marsh y W.A. Sadler. Plenum Press. New  
York and London, 1985, p: 203-208.
  
- FORTUNE, J.E., J. SIROIS y S.M. QUIRK.- The growth and differentiation  
of ovarian follicles during the bovine estrous cycle.  
Theriogenology. 29: 95-109, 1988.
  
- FRANEK, M.- Structural aspects of steroid-antibody specificity.  
J. Steroid Biochem. 28: 95-108, 1987.
  
- FREUND, J. y K. McDERMOTT.- Sensitization to horse serum by means  
of adjuvants.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49: 548-550, 1942.
  
- GARVERICK, H.A., R.E. ERB, G.D. NISWENDER y C.J. CALLAHAN.-  
Reproductive steroids in the bovine. III. Changes during the estrous cycle.  
J. Anim. Sci. 32: 946-956, 1971.

GARVEY, J.S., N.E. CREMER y D.H. SUSSDORF.- Ammonium sulfate precipitation. En: *Methods in immunology*, editado por W.A. Benjamin Inc. Massachusetts, 1977, p: 218-222.

GINTHER, O.J., J.P. KASTELIC y L. KNOPF.- Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*. 32: 787-795, 1989 (a).

GINTHER, O.J., L. KNOPF y J.P. KASTELIC.- Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*. 87:223-230, 1989 (b).

GLENCROSS, R.G., I.B. MUNRO, B.D. SENIOR y G.S. POPE.- Concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , oestrone and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrous cycle and in early pregnancy. *Acta Endocr. Copenh.* 73: 374-384, 1973

GOODFRIEND, L. y A.H. SEHON.- Preparation of the oestrone-protein conjugate. *Can. J. Biochem. Physiol.* 36: 1177-1184, 1958.

GOODFRIEND, L. y A.H. SEHON.- Antigenicity of oestrone-protein conjugates. *Nature*. 185: 764-766, 1960.

GOODFRIEND, L. y A.H. SEHON.- Antibodies to oestrone-protein conjugates. I. Immunochemical studies. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39: 941-960, 1961.

- GOODFRIEND, L. y A. SEHON.- Early approaches to production, analysis, and use of steroid-specific antisera. En: Immunologic methods in steroid determination, editado por F.G. Peron y B.V. Caldwell. New York: Appleton Century Crofts, 1970, p: 63-86.
  
- GOODMAN, A.L. y G.D. HODGEN.- The ovarian triad of the primate menstrual cycle.  
Recent Prog. Horm. Res. 39: 1-73, 1983.
  
- GONZALEZ-PADILLA, E., J.N. WILTBANK y G.D. NISWENDER.- Puberty in beef heifers. 1.- The interrelationship between pituitary, hypothalamic and ovarian hormones.  
J. Anim. Sci. 40: 1091-1104, 1975.
  
- GORE-LANGTON, R.E. y D.T. ARMSTRONG.- Follicular Steroidogenesis and Its Control. En: The Physiology of Reproduction, editado por E. Knobil y J. Neill et al. Raven Press Ltd., New York, 1988, p. 331-385.
  
- GREENWALD, G.S.- Editorial. Of eggs and follicles.  
Am. J. Anat. 135: 1-4, 1972.
  
- GREENWALD, G.S. y P.F. TERRANOVA.- Follicular Selection and Its Control. En: The Physiology of Reproduction, editado por E. Knobil y J. Neill et al., Raven Press Ltd., New York, 1988, p: 387-445.
  
- GROS, C., O. FLECHEUX y F. DRAY.- Enzymatic tracers for steroid EIA. En: Immunoenzymatic assay techniques, editado por R. Malvano. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands, 1980, p: 45-58.
  
- GROVER, P.K. y W.D. ODELL.- Specificity of antisera to sex steroids I. The effect of substitution and stereochemistry.  
J. Steroid Biochem. 8: 121-126, 1977.

- GURAYA, S.S.- Luteinization and steroidogenesis in the follicle wall during preovulatory and ovulatory periods. En: *Biology of ovarian follicles in mammals*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985, p. 221-227.
- GURAYA, S.S.- Follicular Atresia. En: *Biology of ovarian follicles in mammals*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985, p. 228-275.
- GUIDON, J.L., R. THIERRY y S. AVRAMEAS.- Magnetic enzyme immunoassay for measuring human IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 6: 23-27, 1978.
- HABEED, A.F.S.A.- Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*. 14: 328-336, 1966.
- HAMMOND, W.J.- *The physiology of reproduction in the cow*. London, 1927.
- HAMMOND, W.J.- Endocrinological aspects of the ovary. *Brit. med. Bull.* 11: 165-170, 1955.
- HANCOCK, J.L.- Endocrinology of the estrous cycle in cattle. *J. Endocrinol.* 7: 42-46, 1951.
- HANSEL, W. y S.E. ECHTERNKAMP.- Control of ovarian function in domestic animals. *Amer. Zool.* 12: 225-229, 1972.



- HANSEL, W. y J. FORTUNE.- The applications of ovulation control. En: Control of Ovulation, editado por D.B. Crighton, N.B. Haynes, G.R. Foxcroft y G.E. Lamming. Butterworths. London. 1978, p: 237-263, 1978.
- HANSEL, W. y E.M. CONVEY.- Physiology of the oestrus cycle. J. Anim. Sci. 57 (Suppl. 2): 404-424, 1983.
- HANSEN, T.R., R.D. RANDEL y T.H. WELSH Jr.- Granulosa cell steroidogenesis and follicular fluid steroid concentrations after the onset of oestrus in cows. J. Reprod. Fert. 84: 409-416, 1988.
- HEBERT, G.A., P.L. PELHAM y B. PITTMAN.- Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera. Appl. Mic. 25: 26-36, 1973.
- HENDERSON, K.M., A.S. McNEILLY e I.A. SWANSTON: Gonadotrophin and steroid concentration in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. J. Reprod. Fert. 65: 467-473, 1982.
- HOSODA, H., Y. SAKAI, H. YOSHIDA, S. MIYAIRI, K. ISHII y T. NAMBARA.- The preparation of steroid N-hydroxysuccinimide esters and their reactivities with bovine serum albumin. Chem. Pharmac. Bull. 27: 742-746, 1979.
- HOSODA, H., Y. SAKAI, H. YOSHIDA, S. MIYAIRI y T. NAMBARA.- Sensitivity and specificity in enzyme immunoassay of testosterone. Chem. Pharm. Bull. 28: 3035-3040, 1980.

- HOSODA, H., T. KARUBE, N. KOBAYASHI y T. NAMBARA.- Enzyme labeling of steroids by the N-Succinimidyl ester method. Preparation of horseradish peroxidase-labeled antigen for use in enzyme immunoassay. Chem. Pharm. Bull. 33: 249-255, 1985.
- HOSODA, H., N. KOBAYASHI, N. ISHII y T. NAMBARA.- The bridge length effect on sensitivity in steroid enzyme immunoassay. Chem. Pharmac. Bull. 33: 902-904, 1985.
- HOSODA, H., N. KOBAYASHI, N. ISHII y T. NAMBARA.- Bridging phenomena in steroid immunoassays. The effect of bridge length on sensitivity in enzyme immunoassay. Chem Pharm. Bull. 34: 2105-2111, 1986.
- HSUEH, A.J., E.Y. ADASHI, P.B.C. JONES y T.H. WELSH Jr.- Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. Endocr. Rev. 5: 76-127, 1984.
- HURN, B.A.L. y S.M. CHANTLER.- Production of reagent antibodies. Methods in Enzymology 70: 104-115, 1980.
- ILLERA, J.C., D.L. BROOKS, M.J. ILLERA, G. SILVAN y M. ILLERA.- Repercusiones hematológicas de las extracciones reiteradas de sangre en el conejo NZW. Rev. Exp. Anim. 1: 53-58, 1990.
- IRELAND, J.J., P.B. COULSON y R.L. MURPHREE.- Follicular development during four stages of the estrous cycle of beef cattle. J. Anim. Sci. 49: 1261-1269, 1979.

- IRELAND J.J., R.L. MURPHREE y P.B. COULSON.- Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum.  
J. Dairy Sci. 63: 155-160, 1980.
- IRELAND, J.J. y J.F. ROCHE.- Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotrophin receptors.  
Endocrinology. 111: 2077-2086, 1982.
- IRELAND, J.J. y J.F. ROCHE.- Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotrophins.  
Endocrinology. 111: 150-156, 1983 (a).
- IRELAND, J.J. y J.F. ROCHE.- Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotrophins to follicles.  
J. Anim. Sci. 57: 157-167, 1983 (b).
- IRELAND, J.J., R.L. FOGWELL, W.D. OXENDER, K. AMES y J.L. COWLEY.- Production of estradiol by each ovary during the estrous cycle of cows.  
J. Anim. Sci. 59: 764-771, 1984.
- IRELAND, J.J. y J.F. ROCHE.- Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. En: Follicular growth and ovulation rate in farm animals, editado por J.F. Roche y D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster, 1987, p: 1-18.

- IRELAND, J.J.- Control of follicular growth and development.  
J. Reprod. Fert. Suppl 34: 39-54, 1987.
- JANOSKI, A. H., F.C. SHULMAN y G.E. WRIGHT.- Selective 3(O-carboxymethyl)oxime formation in steroidal 3,20-diones for hapten immunospecificity.  
Steroids, 23: 49-64, 1973.
- JOSHI, U.M., H.P. SHAH y S.P. SUDHAMA.- A sensitive and specific enzymeimmunoassay for serum testosterone.  
Steroids, 34: 35-46, 1979.
- JOSHI, U.M., H.P. SHAH y G.M. SANKOLLL.- Pencilillinase as a marker in enzyme-linked immunosorbent assays for steroid hormones.  
J. Steroid Blochem. 19: 419-421, 1983.
- JOYCE, B.G., G.F. READ y D.R. FAHMY.- A specific enzyme immunoassay for progesterone in human plasma.  
Steroids, 29: 761-770, 1977.
- JOYCE, B.G., A. TURKES, A. OZORAN, G.F. READ y D.R. FAHMY.- The development of sensitive enzyme-immunoassay for steroid hormones. En: Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter & Co. Berlin-New York, 1978, p: 247-256.
- KABAKOFF, D.S.- Chemical aspects of enzyme-immunoassay. En: Enzyme-Immunoassay, editado por E.T. Maggio. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1980, p: 71-104.
- KARG, H.- Progesterone concentrations during the estrous cycle of balters. Proc. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. Munich, vol. I, 4d, 1972.



- KELLIE, A.E., V.K. SAMUEL, W.J. RILEY y D.M. ROBERTSON.- Steroid glucuronoside-BSA complexes as antigens: The radioimmunoassay of steroid conjugates.  
J. Steroid Biochem. 3: 275-288, 1972.
- KELLIE, A.E., K.V. LICHMAN y P. SAMARAJEEWA.- Chemistry of steroid-protein conjugate formation. En: Steroid immunoassay. Proceedings of fifth Tenovus workshop, editado por, E.H.D. Cameron, S.G. Hillier y K. Griffiths. Alpha Omega Publishers. LTD, 1975, p: 33-47.
- KESNER, J.S., E.M. CONVEY y C.R. ANDERSON.- Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release.  
Endocrinology 108: 1386-1390, 1981.
- KIM, J.B., A.J. BARNARD, W.P. COLLINS, F. KOHEN, H.R. LINDNER y Z. ESHHAR.- Measurement of plasma estradiol-17 $\beta$  by solid-phase chemiluminescence immunoassay.  
Clin. Chem. 28: 1120-1124, 1982.
- KIM, J.B., A.J. BARNARD, W.P. COLLINS, F. KOHEN, y H.R. LINDNER.- Solid-phase chemiluminescence immunoassay of plasma testosterone.  
J. Steroid Biochem. 18: 625-630, 1983.
- KOHEN, F., Z. HOLLANDER, R.J. CARRICO y R.C. BOGULASKI.- A homogeneous enzyme-immunoassay for estriol monitored by co-enzymic cyclic reactions. En: Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1978, p: 67-80.



- KOHEN, F., J.B. KIM, H.R. LINDNER y W.P. COLLINS.- Development of solid phase chemiluminescence immunoassay for plasma progesterone. *Steroids*. 38: 73-88, 1980.
  
- KRUIP, A.M. y S.J. DIELEMAN.- Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod., Nutr. Dev.* 22: 465-473, 1982.
  
- KRUIP, Th.A.M. y S.J. DIELEMAN.- Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrous cycle. *Theriogenology*. 24: 395-408, 1985.
  
- LACKER, H.M., W.H. BEERS, L.E. MEULI y E. AKIN.- A theory of follicle selection: I. Hypotheses and examples. *Biol. Reprod.* 37: 570-580, 1987 (a).
  
- LACKER, H.M., W.H. BEERS, L.E. MEULI y E. AKIN.- A theory of follicle selection: II. Computer simulation of estradiol administration in the primate. *Biol. Reprod.* 37: 581-588, 1987 (b).
  
- LANDSTEINER, K.- Specificity of serological reactions. Cambridge Mass. Harvard University Press. 1946.
  
- LIEBERMAN, S., B.F. ERLANGER, S.M. BEISER y F.J. AGATE Jr.- Steroid-protein conjugates: their chemical, immunochemical and endocrinological properties. *Recent Prog. Hormone Res.* 15: 165-200, 1959.

- . LINDNER, H.R., E. PEREL, A. FRIEDLANDER y A. ZEITLIN.- Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier.  
Steroids, 19: 357-375, 1972.
- . LIPNER, H.- Mechanism of Mammalian ovulation. En: The physiology of reproduction, editado por E. Knobil y J. Neill. Raven Press, Ltd, New York, 1988, p: 447-487.
- . MAGGIO, E.T.- Enzyme-Immunoassay. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 1-3.
- . MAGGIO, E.T.- Enzymes as immunochemicals labels. En: Enzyme-Immunoassay, editado por E.T. Maggio. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 53-70.
- . MARCUS, G.J. y A.J. HACKETT.- Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction.  
J. Dairy Sci. 69: 818-824, 1986.
- . MARCUS, G.J. y R. DURNFORD.- A simple enzyme-linked immunosorbent assay for testosterone.  
Steroids, 46: 975-986, 1986.
- . MARCUS, G.J y R. DURNFORD.- Estradiol assay by microtitre plate enzyme immunoassay.  
J. of Steroid Biochem. 29: 207-212, 1988.
- . MARION, G.B, H.T GIER y J.B. CHOUDARY.- Micromorphology of the bovine ovarian follicular system.  
J. Anim. Sci. 27: 451-465, 1968.

- . MARION, G.B. y H.T. GIER.- Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal.  
J. Anim. Sci. 32 (Suppl. 1): 24-47, 1972.
  
- . MASSEYEFF, R. y B. FERRUA.- Problems raised by the evaluation of conjugates used in enzyme immunoassays. En: Immunoenzimatic assay techniques, editado por R. Malvano. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands, 1980, p: 28-44.
  
- . MATTON, P., V. ADELAKOUN, Y. COUTURE y J.J. DUFOUR.- Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle.  
J. Anim. Sci. 52: 813-820, 1981.
  
- . MATTOX, V.R., R.D. LITWILLER y A.N. NELSON.- A comparison of procedures for attaching steroidal glucosiduronic acids to bovine serum albumin.  
J. Steroid Biochem. 10: 167-172, 1979.
  
- . MAURASSE, C., P. MATTON y J.J. DUFOUR.- Ovarian follicular populations at two stages of an anoestrus cycle in heifers given high energy diets.  
Journal of Animal Science. 61: 1194-1200, 1985.
  
- . MAUREL, M.C., H. LABROUSSE, M. TERQUI y S. AVRAMEAS.- Microtitre plate enzyme immunoassay of estradiol-17 $\beta$ .  
J. of Steroid Biochem. 25: 48S, Abst 135, 1986.
  
- . McCOMB, R.B. y G.N. BOWERS Jr.- Study of optimum buffer condition for measuring alkaline phosphatase activity in human serum.  
Clin. Chem. 18: 97-104, 1972.



- McCracken, J.A., D.T. BAIRD y J.R. GODING.- Factors affecting the secretion of steroids from the transplanted ovary in the sheep.  
Rec. Prog. Horm. Res. 27: 537-542, 1971.
  
- McLaren, M., J.E. LILLYWHITE y A.C.S. AU.- Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): practical aspects of standardization and quality control.  
Med. Lab. Sci. 38: 245-251, 1981.
  
- McNatty, K.P., D.A. HEATH, K.M. HENDERSON, S. LUN, P.R. HURST, L.M. ELLIS, G. MONTGOMERY, L. MORRISON y D.C. THURLEY.- Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary.  
J. Reprod. Fert. 72: 39-53, 1984.
  
- Merz, E.A., E.R. HAUSER y B.G. ENGLAND.- Ovarian function in the cycling cow: relationship between gonadotrophin binding to theca and granulosa, and steroidogenesis in individual follicles.  
J. Anim. Sci. 52: 1457-1468, 1981.
  
- Meuli, L.E., H.M. LACKER y R.B. THAU.- Experimental evidence supporting a mathematical theory of the physiological mechanism regulating follicle development and ovulation number.  
Biol. Reprod. 37: 589-594, 1987.
  
- Meyer, H.H.D., H. SAUERWEIN y B.M. MUTAYOBA.- Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzyme immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 $\beta$ .  
J. of Steroid Biochem. 35: 263-269, 1990.

- MILES, L.E. y C.N. HALES.- Labelled antibodies and immunological assay systems.  
Nature 219: 186-188, 1968.
  
- MITSUMA, M., A. KAMBEGAWA, S. OKINAGA y K. ARAL.- A sensitive bridge heterologous enzyme immunoassay of progesterone using geometrical isomers.  
J. Steroid Biochem. 28: 83-88, 1987.
  
- MOOR, R.M., H.F. HAY y R.F. SEAMARK.- The sheep ovary: regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation.  
J. Reprod. Fert. 45: 595-604, 1978.
  
- MUNRO, C. y G. STABENFELDT.- Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone.  
J. Endocrinol. 101: 41-49, 1984.
  
- MUNRO, C.J. y B.L. LASLEY.- Non-Radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. En: Non-Radiometric Assays: Technology and Application in Polypeptide and Steroid Hormone detection, editado por Alan R., Liss Inc., 1988, 289-329.
  
- NAKAO, T.- Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum.  
Acta Endocrinol. Copenh. 93: 223-227, 1980.
  
- NAKAO, T., A. SUGGIHASHI, Y. ISHIBASHI, E. TOSA, Y. NAKAGAWA, H. YUTO, T. NOMURA, T. OHE, S. ISHIMI, H. TAKAHASHI, M. KOIWA, N. TSUNODA y K. KAWATA.- Use of milk progesterone enzyme immunoassay for early pregnancy diagnosis in cows.  
Theriogenology. 18: 267-274, 1982.

- NAMBARA, T., M. TAKAHASHI, Y. TUCHIDA y M. NUMAZAWA.-  
Specificity of antisera raised against estradiol using new hapten-carrier  
conjugates.  
Chem. Pharm. Bull. 22: 2176-2180, 1974.
  
- NAMBARA, T., M. NUMAZAWA, T. TANAKA y T. OHKUBO.-  
Preparation of specific antisera to estradiol 17-glucuronide.  
J. steroid Biochem. 9: 785-790, 1977.
  
- NAMBARA, T., K. SHIMADA, T. OHKUBO y T. NIWA.- Preparation and  
antigenic properties of estriol 16-glucuronide and estradiol 17-glucuronide-  
[C-6]-Bovine Serum Albumin conjugates.  
J. steroid Biochem. 16: 533-538, 1982.
  
- NISWENDER, G.D.- Influence of the site of conjugation on the specificity  
of antibodies to progesterone.  
Steroids. 22: 413-420, 1973.
  
- NOVICK, R.P.- Micro-iodometric assay for penicillinase.  
Biochem. J. 83: 236-240, 1962.
  
- OELLERICH, M.- Principles of enzyme-immunoassays. En: Methods of  
enzymatic analysis. Vol. I: Fundamentals, editado por M.V. Bergmeyer.  
Verlag Chemie. Florida, 1983, p: 233-260.
  
- O'SULLIVAN, M.J., J.W. BRIDGES y V. MARKS.- Enzyme immunoassay:  
A review.  
Ann. Clin. Biochem. 16: 221-240, 1979.
  
- PETERS, H. y K.P. McNATTY.- Follicular fluid. En: The Ovary: a  
correlation of structure and function in Mammals. Univ. of Cal. Berkeley  
and Los Angeles. 1980, p: 34-43.

- PETERS, H. y K.P. McNATTY.- Ovarian hormones. En: The Ovary: a correlation of structure and function in Mammals. Univ. of Cal. Berkeley and Los Angeles. 1980, p: 44-59.
  
- PETERS, A.R.- Hormonal control of the bovine oestrus cycle. I. The natural cycle.  
Brit. Vet. J. 141: 564-573, 1985.
  
- PETERS, A.R. y P.J.H. BALL.- Reproduction in cattle. Butterworths Ltd. London. 1987.
  
- PIERSON, R.A. y O.J. GINTHER.- Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers.  
Theriogenology. 26: 649-659, 1986.
  
- PIERSON, R.A. y O.J. GINTHER.- Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day.  
Anim. Reprod. Sci. 14: 165-176, 1987 (a).
  
- PIERSON, R.A. y O.J. GINTHER.- Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum.  
Anim. Reprod. Sci. 14: 177-186, 1987 (b).
  
- PRAKASH, B.S., H.H.D. MEYER, E. SCHALLENBERGER y D.F.M. VAN DE WIEL.- Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique.  
J. Steroid Biochem. 28: 623-627, 1987.

- PRESSMAN, D. y A.L. GROSSBERG.- Structural basis of antibody specificity. En: Immunological methods in steroid determination, editado por F.G. Peron y B.V. Caldwell. New York: Appleton Century Crofts, 1970, p. 1-14.
- QUIRK, S.M., G.J. HICKEY y J.E. FORTUNE.- Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrus cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 $\alpha$ -induced luteolysis. J. Reprod. Fert. 77: 211-219, 1986.
- RAHE, C.H., R.E. OWENS, J.L. FLEEGER, H.J. NEWTON y P.G. HARMS.- Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. Endocrinology 107: 498-505, 1980.
- RAJAKOSKI, E.- The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. Acta Endocrinol. 52 (Suppl. I): 1-68, 1960.
- RAJKOWSKI, K.M., N. CITTANOVA, B. DESFOSSES y M.F. JAYLE.- The conjugation of testosterone with horseradish peroxidase and a sensitive enzyme assay for the conjugate. Steroids. 29: 701-713, 1977.
- RAJKOWSKI, K.M., N. CITTANOVA, P. URIOS y M.F. JAYLE.- An enzyme-linked immunoassay of testosterone. Steroids. 30: 129-137, 1977.
- RAJKOWSKI, K.M., N. CITTANOVA, B. DESFOSSES, P. URIOS y M.F. JAYLE.- An enzyme-labelled immunoassay of testosterone. En: Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter & Co. Berlin-New York, 1978, p: 311-325.

- REECE, R.P. y C.W. TURNER.- The functional activity of the right and left bovine ovary.  
J. Dairy Sci. 21: 37-39, 1938.
- RECIO, P., A. LABADIA, M. CRUZ y A. GARCIA-SACRISTAN.- Correlation between homologous and heterologous enzymeimmunoassays for progesterone determinations in milk from cows.  
Rev. Esp. Fisiol. 46: 303-308, 1990.
- RIAD-FAHMY, D., G.F. READ, B.G. JOYCE y R.F. WALKER.- Steroid immunoassays in endocrinology. En: Immunoassays for the 80's, editado por A. Voller, A. Barlett y D. Bidwell. MTP Press, Ltd., Lancaster, England, 1981, p: 205-261.
- RILEY, W.J., E.R. SMITH, D.M. ROBERTSON y A.E. KELLIE.- The formation of steroid-BSA antigens via a C-6 $\beta$ -carboxymethyl substituent.  
J. Steroid Biochem. 3: 357-367, 1972.
- ROCHE, J.F. y J.J. IRELAND.- The differential effect of progesterone on concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers.  
Endocrinology 108: 568-570, 1981.
- ROCHE, J.F. y M.P. BOLAND.- Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states.  
Theriogenology. 35: 81-90, 1991.
- RUBENSTEIN, K.E., R.S SCHNEIDER y E.F. ULLMAN.- Homogeneous enzyme-immunoassay. A new immunochemical technique.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 846-852, 1972.

- SACH, H., y A. KLOPSTOCK.- Die serologisch differenzierung von lecithin und cholesterin.  
Biochem. Z. 159: 491-501, 1925.
- SACH, H., A. KLOPSTOCK y A.J. WEIL.- Die entstehung der syphilitischen blutveraenderung.  
Deutsch. Med. Wschr. 51: 589-592, 1925.
- SADEH, D., E. SELA y C.S. HEXTER.- Novel enzyme immunoassay for  $17\beta$ -estradiol.  
J. Immun. Meth. 28: 125-131, 1979.
- SAIZ, F., C BORQUE, M. CRUZ, V. DOMENECH y C. SIMON.- Puesta a punto de un método enzimoimmunoanalítico (EIA) para evaluar progesterona en leche de vaca.  
Zootecnia 35: 9-16, 1987.
- SAUER, M.J., J.A. FOULKES y A.D. COOKSON.- Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk.  
Steroids. 38: 45-53, 1981.
- SAUER, M.J., J.A. FOULKES y P.M. O'NEILL.- Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: Application of heterologous systems for improved sensitivity.  
Br. Vet. J. 138: 522-532, 1982 (a).
- SAUER, M.J., A.D. COOKSON, B.J. MAC DONALD y J.A. FOULKES.- The use of enzyme immunoassay for the measurement of hormones with particular reference to the determination of progesterone in unextracted whole milk. En: The ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis, editado por R.C. Wardley y J.R. Crowther. Martinus Nijhoff Publishers. The Hague/ Boston/ London, 1982 b, p: 271-

- SAUER, M.J., J.A. FOULKES, A. WORSFOLD y B.A. MORRIS.- Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle.  
*J. Reprod. Fert.* 76: 375-391, 1986.
  
- SAUER, M.J., J.A. FOULKES y P.M. O'NEILL.- A comparison of alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, penicillinase and peroxidase used as labels for progesterone determination in milk by heterologous microtitre plate enzymeimmunoassay.  
*J. steroid Biochem.* 33: 423-431, 1989 (a).
  
- SAUER, M.J., J.A. FOULKES y P.M. O'NEILL.- The influence of heterology, enzyme label and assay conditions on the sensitivity of microtitre plate enzymeimmunoassays for progesterone in milk.  
*J. Steroid Biochem.* 33: 433-438, 1989 (b).
  
- SAVIO, J.D., L. KEENAN, M.P. BOLAND y J.F. ROCHE.- Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers.  
*J. Reprod. Fert.* 83: 663-671, 1988.
  
- SAVIO, J.D., M.P. BOLAND, N. HYNES y J.F. ROCHE.- Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows.  
*J. Reprod. Fert.* 88: 569-579, 1990.
  
- SCHALLENBERGER, E., D. SCHAMS, B. BULLERMANN y D.L. WALTERS.- Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow.  
*J. Reprod. Fert.* 71: 493-501, 1984.



- SCHALLENBERGER, E., A.M. SCHÖNDORFER y D.L. WALTERS.- Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrus cycle. *Acta Endocrinol.* 108: 312-321, 1985.
- SCHAMS, D. y E. SCHALLENBERGER.- Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone and its application during the oestrus cycle in cattle. *Acta Endocrinol. Copenh.* 81: 461-473, 1976.
- SCHAMS, D., E. SCHALLENBERGER, B. HOFFMAN y H. KARG.- The oestrus cycle of the cow: Hormonal parameters and time relationships concerning oestrus, ovulation, and electrical resistance of the vaginal mucus. *Acta Endocrinol. Copenh.* 86: 180-192, 1977.
- SCHAMS, D., E. SCHALLENBERGER, S. GOMBE y H. KARG.- Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *J. Reprod. Fert. Suppl* 30: 103-110, 1981.
- SCHUURS, A.H.W.M. y B.K. VAN WEEMEN.- Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool. *J. of Immunoassay.* 1: 229-249, 1980.
- SEEGER, K., H. THUROW, W. HAEDER y E. KNAPPE.- An enzyme immunoassay (EIA) for progesterone in horse plasma. *J. Immunol. Meth.* 28: 211-217, 1979
- SHEENAN, J.C. y J.P. HESS.- A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1067-1070, 1955.

- SHIMADA, K., T. OHKUBO, M. TANAKA, F. YOSHIDA y T. NAMBARA.- Preparation of specific antiserum to estradiol 3-glucuronide. *J. steroid Biochem.* 17: 511-515, 1982.
  
- SORENSEN, A.J., W. HANSEL, W.H. HOUGH, D.T. ARMSTRONG, K. McENTEE y R.W. BRATTON.- Causes and prevention of reproductive failures in dairy cattle. I. Influence of underfeeding and overfeeding on growth and development of Holstein heifers. *Bull. Cornell Univ. agric. Exp. Stn.* 12: 936-951, 1959.
  
- SPICER L.J., E.M. CONVEY, K. LEUNG, R.E. SHORT y H.A. TUCKER.- Anovulation in postpartum suckled beef cows. I. Associations among size and numbers of ovarian follicles, uterine involution, and hormones in serum and follicular fluid. *J. Anim. Sci.* 62: 734-741, 1986 (a).
  
- SPICER L.J., E.M. CONVEY, K. LEUNG, R.E. SHORT y H.A. TUCKER.- Anovulation in postpartum suckled beef cows. II. Associations among binding of  $^{125}$ I-labeled gonadotrophins to granulosa and thecal cells, and concentrations of steroids in serum and various sized ovarian follicles. *J. Anim. Sci.* 62: 742-750, 1986 (b).
  
- SPICER, L.J., P. MATTON, S.E. ECHTERNKAMP, E.M. CONVEY y M.A. TUCKER.- Relationships between histological signs of atresia, steroids in follicular fluid, and gonadotropin binding in individual bovine antral follicles during post-partum anovulation. *Biol. Reprod.* 36: 890-898, 1987.
  
- SPICER, L.J. y S.A. ZINN.- Relationship between concentrations of cortisol in ovarian follicular fluid and various biochemical markers of follicular differentiation in cyclic and anovulatory cattle. *J. Reprod. Fert.* 81: 221-226, 1987.

- STABENFELDT, G.H., L.L. EWING y L.E. McDONALD.- Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 19: 433-439, 1969.
- STAIGMILLER, R.B. y B.G. ENGLAND.- Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology* 17: 43-52, 1982.
- SWANSON, L.V., H.D. HAFS y D.A. MORROW.- Ovarian characteristics and serum LH, prolactin, progesterone and glucocorticoid from first estrus to breeding size in holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 34: 284-293, 1972.
- TALLON, D.F., J.P. GOSLING, P.M. BUCKLEY, M.M. DOOLEY, W.F. CLEERE, E.M. O'DWYER y P.F. FOTTRELL.- Direct solid-phase enzymeimmunoassay of progesterone in saliva. *Clin. Chem.* 30: 1507-1511, 1984.
- TANAKA, T., N. SUGURO, SHIRATORI y A. KUBODERA.- Specific antisera for the radioimmunoassay of estradiol-3-sulfate. *J. steroid Biochem.* 22: 285-288, 1985.
- TATESISHI, K., H. YAMATO, T. OGIHARA y C. HAYASHI.- Enzyme immunoassay of serum testosterone. *Steroids* 30:25-32, 1977.
- TATEISHI, K., T. HAMAOKA, K. TAKATSU y C. HAYASHI.- A novel immunization procedure for production of anti-testosterone and anti-5 $\alpha$ -dihydrotestosterone antisera of low cross-reactivity. *J. Steroid Biochem.* 13: 951-959, 1980.

- THORNE, C.J.R.- Techniques for determining protein concentration. En: Techniques in protein and enzyme Biochemistry, B 104. Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1978, p: 1-18.
- THORNEYCROFT, I.H., S.A. TILLSON, G.E. ABRAHAM, R.J. SCARAMUZZI y B.V. CALDWELL.- Preparation and purification of antibodies to steroids. En: Immunologic methods in steroid determination, editado por F.G. Peron y B.V. Caldwell. New York: Appleton Century Crofts, 1970, 63-86.
- TIEFENAUER, L.X. y R.Y. ANDRES.- Prevention of bridge binding effects in haptenic immunoassay systems exemplified by an iodinated radioimmunoassay for melatonin.  
J. Immun. Meth. 74: 293-298, 1984.
- TIEFENAUER, L.X., D.M. BODMER, W. FREI y R.Y. ANDRES.- Prevention of bridge binding in immunoassays: a general estradiol tracer structure.  
J. Steroid Biochem. 32: 251-257, 1989.
- TUSSEN, P.- Practice and theory of enzyme immunoassays. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, editado por R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg. Elsevier. Amsterdam. New York. Oxford, 1985.
- TONETTA, S.A. y G.S. dIZEREGA.- Intraovarian regulation of follicular maturation.  
Endocr. Rev. 10: 205-229, 1989.
- TSAFRIRI, A.- Local nonsteroidal regulators of ovarian function. En: The Physiology of Reproduction, editado por E. Knobil y J. Neill et al. Raven Press Ltd., New York, 1988, p: 527-565.

- TSUJI, A., M. MAEDA, H. ARAKAWA, S. SHIMIZU, T. IKEGAMI, Y. SUDO, H. HOSODA y T. NAMBARA.- Fluorescence and chemiluminescence enzyme immunoassay of 17- $\alpha$ -hydroxy-progesterone in dried blood spotted on filter paper.  
J. Steroid Biochem. 27: 33-40, 1987.
- TURKES, A., A.O. TURKES, B.G. JOYCE, G.F. READ y D. RIAD-FAHMY.- A sensitive solid phase enzyme immunoassay for testosterone in plasma and saliva.  
Steroids. 33: 347-359, 1979.
- VAITUKAITIS, J.L., J.B. ROBBINS, E. NIESCHLAG y G.T. ROSS.- A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.  
J. clin. Endocr. Metab. 33: 988-991, 1971.
- VAITUKAITIS, J. L.- Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections.  
Methods in Enzymology. 73: 46-52, 1981.
- VAN DE WIEL, D.F.M. y W. KOOPS.- Direct measurement of progesterone in milk and plasma by a sensitive and simple enzymeimmunoassay.  
Br. vet. J. 138: 454, 1982.
- VAN DE WIEL, D.F.M. y W. KOOPS.- Development and validation of an enzymeimmunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma.  
Anim. Reprod. Sci. 10: 201-213, 1986.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Immunoassay using antigen enzyme conjugates.  
FEBS Lett. 15: 232-237, 1971.

- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Immunoassay using hapten-enzyme conjugates.  
FEBS Letters 24: 77-81, 1972.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays.  
Immunochemistry. 12: 667-670, 1975.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Sensitivity and specificity of hapten enzyme-immunoassays. En: First International Symposium on Immunoenzymatic Techniques INSERM. Symposium nº 2, editado por Feldmann, E. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1976, p: 125-133.
- VAN WEEMEN, B.K., A.M.G. BOSCH, E.C. DAWSON y A.H.W.M. SCHUURS.- Enzyme-immunoassays of steroids: possibilities and pitfalls.  
J. Steroid Biochem. 11: 147-151, 1979.
- VOLLER, A. y D.E. BIDWELL.- A simple method for detecting antibodies to Rubella.  
Brit. J. Exp. Path. 56: 338-339, 1975.
- VOLLER, A.- Heterogeneous enzyme-immunoassays and their applications. En: Enzyme-Immunoassay, editado por E.T. Maggio. CRC Press. Boca Raton, Florida, 1980, p: 181-196.
- WALKER, C.S., S.J. CLARK y H.H. WOTIZ.- Factors involved in the production of specific antibodies to estriol and estradiol.  
Steroids. 21: 259-283, 1973.

- WALTERS, D.L., C.C. KALTENBACH, T.G. DUNN y R.E. SHORT.- Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows. I. Effect of suckling on serum and follicular fluid hormones and follicular gonadotropin receptors.  
Biol. Reprod. 26: 640-646, 1982.
- WALTERS, D.L., D. SCHAMS y E. SCHALLENBERGER.- Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrus cycle in the cow.  
J. Reprod. Fert. 71: 479-491, 1984.
- WALTERS, D.L. y E. SCHALLENBERGER.- Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and oxytocin during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow.  
J. Reprod. Fert. 71: 503-512, 1984.
- WANG, H.X., R.A. STOTT, G.H.G., L.J. KRICKA, G. HOLDER y B.T. RUDD.- An enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay for serum progesterone.  
Steroids. 44: 317-328, 1984.
- WEBB, R., G.E. LAMMING, N.B. HAYNES y G.R. FOXCROFT.- Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarian activity in postpartum dairy cows.  
J. Reprod. Fert. 59: 133-143, 1980.
- WEINSTEIN, A., H.R. LINDNER, A. FRIEDLANDER y S. BAUMINGER.- Antigenic complexes of steroid hormones formed by coupling to protein through position 7. Preparation from 4-3-oxo-steroids and characterization of antibodies to testosterone and androstenedione.  
Steroids. 20: 789-812, 1972.

- WETTEMANN, R.P., H.D. HAFS, L.A. EDGERTON y L.V. SWANSON.- Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 34: 1020-1024, 1972.
- WHITE, A., C. GRAY y J.E.T. CORRIE.- Monoclonal antibodies to testosterone: The effect of immunogen structure on specificity. *J. Steroid Biochem.* 22: 169-175, 1985.
- WHITE, A., G.N. SMITH, S.R. CROSBY y W.A. RATCLIFFE.- A study of 19-O-carboxymethyl ether and 19-hemisuccinate derivatives of testosterone: their immunogenicity and use as iodinated radioligands for radioimmunoassay of testosterone. *J. Steroid Biochem.* 23: 981-989, 1985.
- WHITEHOUSE, M.W.- The Adjuvant. En: *Immunochemistry, an advanced text-book*, editado por L.E. Glynn y M.V. Steward. New York: Wiley, 1977, p: 571-580.
- WICKINGS, E.J. C.A. TAFURT, H. HOOGEN y E. NIESCHLAG.- The development of titer and specificity of antibodies to testosterone. *J. Steroid Biochem.* 8: 147-150, 1977.
- WIMPY, T.H., C.F. CHANG, V.L. ESTERGREEN y J.K. HILLERS.- Milk progesterone enzyme immunoassay: modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69: 1115-1121, 1986.
- WISDOM, G.B.- Enzyme immunoassay. *Clin. Chem.* 22: 1243-1250, 1976.



- WISE, T.H., D. CATON, W.W. THATCHER, A. RAMI y M.J. FIELDS.- Androstenedione, dehydroepiandrosterone and testosterone in ovarian vein plasma and androstenedione in peripheral arterial plasma during the bovine oestrus cycle.  
J. Reprod. Fert. 66: 513-518, 1982.
- WISE, T.- Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size rank, atresia classification and day of oestrus cycle.  
J. Anim. Sci. 64: 1153-1169, 1987.
- WRIGHT, K., D.C. COLLINS y J.R.K. PREEDY.- Comparative specificity of antisera raised against estrone, estradiol 17- $\beta$  and estriol using 6-O-carboxymethyloxime bovine serum albumin derivatives.  
Steroids. 21: 755-769, 1973.
- YALOW, R.S. y S.A. BERSON.- Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.  
Nature. 184: 1648-1649, 1959.
- YALOW, R.S. y S.A. BERSON.- Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.  
J. Clin. Invest. 39: 1157-1162, 1960.
- YORDE, D.E., P.E. PLUTA y E.A. SASSE.- Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. Measurement of human choriogonadotrophin, testosterone and Rubella antibody. En: Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter & Co. Berlin-New York, 1978, p: 359-372, 1978.
- ZARCO, L.- EIA for estradiol-17 $\beta$  (resultados sin publicar).